

**PENGARUH SALEP KOLAGEN HIDROLISAT
TERHADAP EKSPRESI *Vascular Endothelial
Growth Factor* (VEGF) DAN KETEBALAN
EPIDERMIS PADA PENYEMBUHAN
LUKA BAKAR DERAJAT IIB
TIKUS (*Rattus novergicus*)**

SKRIPSI

Oleh:
SABRINA DOLOKSARIBU
145130101111051



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH SALEP KOLAGEN HIDROLISAT
TERHADAP EKSPRESI *Vascular Endothelial
Growth Factor* (VEGF) DAN KETEBALAN
EPIDERMIS PADA PENYEMBUHAN
LUKA BAKAR DERAJAT IIB
TIKUS (*Rattus novergicus*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
SABRINA DOLOKSARIBU
145130101111051



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Salep Kolagen Hidrolisat Terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan Ketebalan Epidermis Pada Penyembuhan Luka Bakar Derajat IIB Tikus (*Rattus novergicus*)

Oleh:

SABRINA DOLOKSARIBU
145130101111051

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 24 Juli 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I



Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES
NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Analis Wisnu Wardahana, M. Biomed
NIP. 19800904 200812 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Sabrina Doloksaribu
NIM : 145130101111051
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Salep Kolagen Hidrolisat Terhadap Ekspresi
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dan Ketebalan
Epidermis Pada Penyembuhan Luka Bakar Derajat IIB Tikus
(*Rattus novergicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala risiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 Juli 2018
Yang menyatakan,

(Sabrina Doloksaribu)
145130101111051

**PENGARUH SALEP KOLAGEN HIDROLISAT TERHADAP EKSPRESI
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) DAN KETEBALAN
EPIDERMIS PADA PENYEMBUHAN LUKA BAKAR
DERAJAT IIB TIKUS (*Rattus norvegicus*)**

ABSTRAK

Luka bakar merupakan bentuk cedera kulit yang disebabkan oleh sentuhan langsung benda panas. Proses penyembuhan luka dimulai dari awal terjadinya cedera hingga luka menutup sempurna. Kolagen hidrolisat adalah kolagen yang terhidrolisis dengan zat aktif berupa kolagen yang dapat membantu proses hemostasis, agregasi trombosit, proliferasi epitel, dan meningkatkan faktor pertumbuhan. VEGF adalah salah satu faktor pertumbuhan yang mempengaruhi proses angiogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian salep kolagen hidrolisat terhadap ekspresi VEGF dan ketebalan epidermis sebagai penyembuhan luka bakar. Hewan coba dalam penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat 150-200g berumur 8-12 minggu. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok terapi burnazin, perlakuan 1, 2, dan 3 yang diterapi menggunakan konsentrasi 5%, 7,5%, dan 10% pada daerah luka bakar yang diberikan dua kali sehari selama 10 hari. Ekspresi VEGF menggunakan metode immunohistokimia dan ketebalan epidermis diamati secara histopatologi dengan pewarnaan Hemaktosilin Eosin (HE). Analisis data menggunakan uji one way ANOVA dan uji lanjutan uji Tukey ($\alpha=5\%$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian salep kolagen hidrolisat dapat meningkatkan ekspresi VEGF dengan rata-rata ekspresi 55,63% dan ketebalan epidermis dengan rata-rata ketebalan 21,65 μ m pada tikus yang diinduksi dengan luka bakar derajat IIB. Kesimpulan dari penelitian ini adalah salep kolagen hidrolisat dapat digunakan sebagai alternatif terapi pada pengobatan luka bakar.

Kata kunci : Luka Bakar, Salep Kolagen Hidrolisat, VEGF, Ketebalan Epidermis.

**THERAPEUTIC EFFECT OF TOPICAL COLLAGEN HYDROLYSATE
TOWARD EXPRESSION *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)
AND EPIDERMIS THICKNESS OF BURNS WOUND
HEALING ON RATS (*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

Burns are skin injury caused by a direct touch of a hot object. The wound healing process starts from the beginning of the injury until the wound closes perfectly. Collagen hydrolysate is collagen which is hydrolysate with active substances in the form of collagen which can help the process of hemostasis, platelet aggregation, epithelial proliferation, and increase growth factor. VEGF is one of the growth factors that affects the angiogenesis process. This study aims to determine the effect of topical therapy of skin ointment marked by VEGF expression and the thickness of the epidermis as a healing of burn. The animal models were male rats (*Rattus norvegicus*) with weighed 150-200g, 8-12 weeks old. This research uses four groups of rats, namely burnazin therapy, treatment group of hidrolysate collagen concentration 5%, 7,5%, and 10% in the burn area given twice a day for ten days. VEGF expression were evaluated using immunohistochemistry and histopatological epidermal thickness observed with Hematoksilen Eosin staining (HE). The data were analyzed using one-way ANOVA test and followed by Tukey test ($\alpha=5\%$). The results showed that collagen hydrolyzate ointment increased VEGF expression up to 53.65% and epidermal thickness with average thickness of 21.65 μ m on rats induced by IIB burn injury. The conclusion of this study is that collagen hydrolyzate ointment can be used as an alternative treatment for burn therapy.

Keywords: Burns, Hydrolysate Collagen, VEGF, Epidermis Thickness.

KATA PENGANTAR

Puji Syukur Kehadirat Tuhan Yesus Kristus yang melimpahkan segala berkat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Salep Kolagen Hidrolisat Terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan Ketebalan Epidermis Pada Penyembuhan Luka Bakar Derajat IIB Tikus (*Rattus novergicus*)”**. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih terutama kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES selaku Dosen Pembimbing I dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
2. drh. Analis Wisnu Wardhana, M. Biomed selaku Dosen Pembimbing II atas bimbingan, saran, kesabaran, fasilitas, serta waktu yang telah diberikan selama ini kepada penulis. .
3. drh. M. Arfan Lesmana, M. Sc selaku dosen penguji I yang telah memberikan waktu, masukan, kritik dan saran kepada penulis.

4. drh. Mira Fatmawati, M. Si selaku dosen penguji II atas waktu, arahan dan masukan yang sangat berguna bagi penulis untuk memperbaiki penyusunan skripsi ini.
5. Keluarga tercinta Ayahanda Lukman Doloksaribu, Ibunda Moina Sianipar, serta adik penulis yang sangat disayangi Jopi Doloksaribu untuk doa, kasih sayang, dukungan, serta pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
6. Tim penelitian skripsi yaitu Lutfiana, Ajeng, dan Wafa atas kerjasamanya selama penelitian yang telah banyak membantu dan memberikan dukungan kepada penulis.
7. Seluruh staf dan karyawan FKH, yang telah membantu proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
8. Keluarga PMK VETERINER, CHELONIA, dan AVANGERS atas semangat, bantuan, keceriaan, dan kebersamaan selama ini.
9. Serta semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Akhir kata penulis berharap semoga Tuhan membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Penulis berharap skripsi ini dapat diterima sehingga dapat memberikan pengalaman serta wawasan bukan hanya bagi penulis namun bagi para pembaca pada umumnya.

Malang, 24 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Luka	7
2.1.1 Luka Bakar	7
2.1.2 Etiologi Luka Bakar	8
2.1.3 Klasifikasi Luka Bakar	9
2.1.4 Patomekanisme Luka Bakar	11
2.1.5 Zona Kerusakan Jaringan	12
2.1.6 Fase Penyembuhan Luka	13
2.2 Kulit	18
2.2.1 Anatomi Kulit	18
2.2.2 Struktur Kulit	19
2.3 Hidrolisat Kolagen	21
2.4 Salep Sebagai Terapi Topikal	23
2.5 <i>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</i>	25
2.6 Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>)	27

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	29
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	29
3.2 Hipotesa Penelitian	32
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	33
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	33
4.2 Sampel Penelitian	33
4.3 Rancangan Penelitian	34
4.4 Alat dan Bahan	35
4.5 Variabel Penelitian	35
4.6 Tahapan Penelitian	35
4.7 Prosedur kerja	36
4.7.1 Persiapan Hewan Coba.....	36
4.7.2 Pembuatan Salep Kolagen Hidrolisat	37
4.7.3 Perlakuan Luka Bakar Derajat IIB Pada Hewan Coba.....	37
4.7.4 Pemberian Terapi Salep Kolagen Hidrolisat	38
4.7.5 Euthanasi dan Pengambilan Kulit.....	38
4.7.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit dengan Pewarnaan HE.....	38
4.7.7 Ekspresi VEGF dengan Metode Imunohistokimia.....	40
4.7.8 Tahap perhitungan ketebalan epidermis	42
4.7.9 Analisa data	42
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	43
5.1 Pengaruh Pemberian Salep Kolagen Hidrolisat Terhadap Ekspresi VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) Pada Luka Bakar Derajat IIB	45
5.2 Pengaruh Pemberian Salep Kolagen Hidrolisat Terhadap Ketebalan Epidermis Pada Luka Bakar Derajat IIB	48
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	55
6.1 Kesimpulan.....	55
6.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	34
5.1 Ekspresi VEGF(<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	47
5.2 Ketebalan Epidermis	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Luka Bakar Derajat I.....	9
2.2 Luka Bakar Derajat II.....	10
2.3 Luka Bakar Derajat III	11
2.4 Zona kerusakan jaringan	13
2.5 Lapisan Kulit.....	18
2.6 Lapisan Epidermis	19
2.8 Tikus (<i>Rattus novergicus</i>)	27
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	29
5.1 Gambaran Makroskopis Kulit.....	43
5.2 Ekspresi VEGF Jaringan Kulit Tikus.....	45
5.3 Gambaran Histopatologi Epidermis Kontrol Positif	50
5.4 Gambaran Histopatologi Epidermis Perlakuan 1	50
5.5 Gambaran Histopatologi Epidermis Perlakuan 2.....	51
5.6 Gambaran Histopatologi Epidermis Perlakuan 3.....	51

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Singkatan	Keterangan
%	: Persen
g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
°C	: Derajat Celcius
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
ECM	: <i>Extra Cellular Matrix</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAG	: <i>Glycosaminoglycan</i>
HE	: Hematoksilin-Eosin
IL-1	: <i>Interlukin-1</i>
IL-6	: <i>Interlukin-6</i>
IGF	: <i>Insulin Growth Factor</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
PDGF	: <i>Platelet Derivate Growth Factor</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i>
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka bakar adalah kondisi kerusakan jaringan yang diakibatkan sentuhan langsung dengan sumber panas seperti air panas, api, bahan kimia, listrik, dan radiasi (Nina, 2008). Luka bakar merupakan salah satu jenis trauma dengan angka morbiditas dan mortalitas yang cukup tinggi. Kedalaman luka bakar akan mempengaruhi tingkat keparahan, kerusakan, atau gangguan dari kematian sel pada kulit. Berdasarkan derajat kedalamannya luka bakar dapat digolongkan menjadi tiga, yaitu derajat pertama superfisial, derajat kedua ketebalan parsial superfisial (II A), derajat kedua ketebalan parsial dalam (II B), dan derajat ketiga ketebalan penuh. Luka bakar menjadi salah satu insiden yang sering terjadi di masyarakat dan ditemukan terbanyak adalah luka bakar derajat II (Nurdiana dkk., 2008). Data yang dikutip dari Sofyan dkk (2013) menyebutkan luka bakar derajat II mencapai 46,7% dari seluruh kasus luka bakar. Luka bakar derajat IIB menyebabkan kerusakan pada seluruh lapisan epidermis dan $\frac{1}{2}$ sampai $\frac{7}{8}$ lapisan dermis (William dan Hopper, 2007).

Data *World Fire Statistics Centre* (2008) menyebutkan bahwa Singapura adalah negara dengan tingkat prevalensi luka bakar terendah berkisar antara 0,12% sedangkan tertinggi adalah Hongaria sebesar 1,98% (Yuliani dan Tasmiatun, 2012). Di Indonesia menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2013) prevalensi luka bakar tertinggi di Provinsi Nanggroe Aceh Darussalam dan Kepulauan Riau sebesar 3,8%. Kasus luka bakar pernah

terjadi di India pada 14 ekor hewan ternak berupa sapi dan kerbau (Morwal, 2016). Menurut Fowler (2013) kebakaran yang terjadi setiap tahunnya mengalami kenaikan intensitas dan membawa dampak mengkhawatirkan bagi kehidupan hewan liar seperti cacat hingga kematian.

Proses penyembuhan luka adalah proses biologis yang berlangsung di dalam tubuh (Guo dan Dipietro, 2010). Proses ini terdiri dari empat fase, yaitu fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodelling*. Fase hemostasis atau biasa disebut dengan fase perdarahan terjadi segera setelah terjadinya cedera. Fase inflamasi berlangsung hingga hari kelima pasca terjadinya cedera. Pada fase inflamasi terjadi vasodilatasi yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas kapiler sehingga neutrofil dan monosit akan bermigrasi pada lokasi cedera. Fase ini ditandai dengan bengkak, kemerahan, nyeri, dan hangat. Selanjutnya adalah fase proliferasi dimana fase ini dimulai dari hari ke 6 hingga hari ke 21 pasca terjadinya cedera. Fase ini ditandai dengan proses angiogenesis dan re-epitelisasi. Faktor proangiogenik seperti VEGF yang dihasilkan oleh makrofag akan membantu proses angiogenesis. Fase *remodelling* adalah akhir dari fase penyembuhan luka. Tujuan dari fase ini adalah penyempurnaan jaringan baru dan berakhir hingga kurang lebih 12 bulan. Penyembuhan luka sangat dipengaruhi oleh fase ini karena semakin cepat proses *remodelling* maka semakin cepat pula proses penutupan luka (Prasetyo dkk., 2010).

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) merupakan angiogenesis yang berfungsi untuk membentuk pembuluh darah baru pada jaringan yang

luka. VEGF disekresi oleh neutrofil, makrofag teraktivasi, fibroblast dan akan muncul pada fase proliferasi. VEGF merangsang penyembuhan luka melalui beberapa mekanisme diantaranya deposisi kolagen, angiogenesis, dan re-epitelisasi.

Salah satu obat *gold standard* pada penanganan luka bakar yang tersedia di pasaran menggunakan obat dengan kandungan *silver sulphadiazine* yang merupakan obat topikal anti mikroba golongan *sulfonamide*. Penggunaan obat golongan ini memiliki beberapa kelemahan seperti harganya yang relatif mahal dan cenderung panas di kulit. Pengobatan alternatif yang dapat digunakan dalam pengobatan luka bakar adalah kolagen. Ikan merupakan salah satu bahan baku penghasil kolagen. Kolagen yang bersumber dari jaringan ikat pada kulit dan tulang ikan memiliki struktur molekul lebih kecil dibandingkan sapi dan babi sehingga lebih mudah untuk diserap. Ketersediaan kolagen pada ikan memungkinkan diproduksi hidrolisat kolagen. Hidrolisat kolagen memiliki peran dalam membantu sintesis kolagen pada bagian tubuh seperti tulang, pembuluh darah, dan lapisan dermis pada kulit (Kumar, *et al.*, 2011). Dalam proses penyembuhan luka kolagen bekerja sebagai agregasi trombosit karna kemampuannya dapat mengikat fibronectin. Fibronectin merupakan komponen matriks yang mendukung proses migrasi keratinosit ke daerah perlukaan. Kolagen juga mempunyai kemampuan kemotaksis terhadap monosit (Novriansyah, 2008).

Pengobatan pada kasus kejadian luka bakar telah mengalami perkembangan yang sangat pesat. Umumnya penggunaan terapi yang

digunakan yaitu aplikasi secara topikal. Pengaplikasian obat secara topikal memiliki efek terhadap penyembuhan luka berupa kelembaban sehingga akan menstimulasi serabut kolagen dan akan mempercepat proses kesembuhan luka. Salep merupakan sediaan farmasi berbentuk semi solid berbahan dasar lemak yang sering digunakan untuk penyembuhan luka. Salep ditujukan untuk kulit dan mukosa. Sediaan ini digunakan karena mudah diserap oleh kulit dan mudah dicuci dengan air. Salep digunakan untuk pengobatan lokal, melindungi kulit yang luka agar tidak terinfeksi, serta dapat melembabkan kulit (Kusumawardani dkk, 2015).

Berdasarkan latar belakang diatas, maka penelitian ini akan mempelajari peran dan potensi salep kolagen hidrolisat untuk menyembuhkan luka bakar derajat IIB melalui ekspresi VEGF dan ketebalan epidermis pada hewan model tikus putih jantan (*Rattus novergicus*).

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian salep kolagen hidrolisat dapat meningkatkan ekspresi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) pada luka bakar derajat IIB tikus putih (*Rattus novergicus*)?
2. Apakah pemberian salep kolagen hidrolisat dapat meningkatkan perkembangan ketebalan epidermis pada luka bakar derajat IIB tikus putih (*Rattus novergicus*)?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

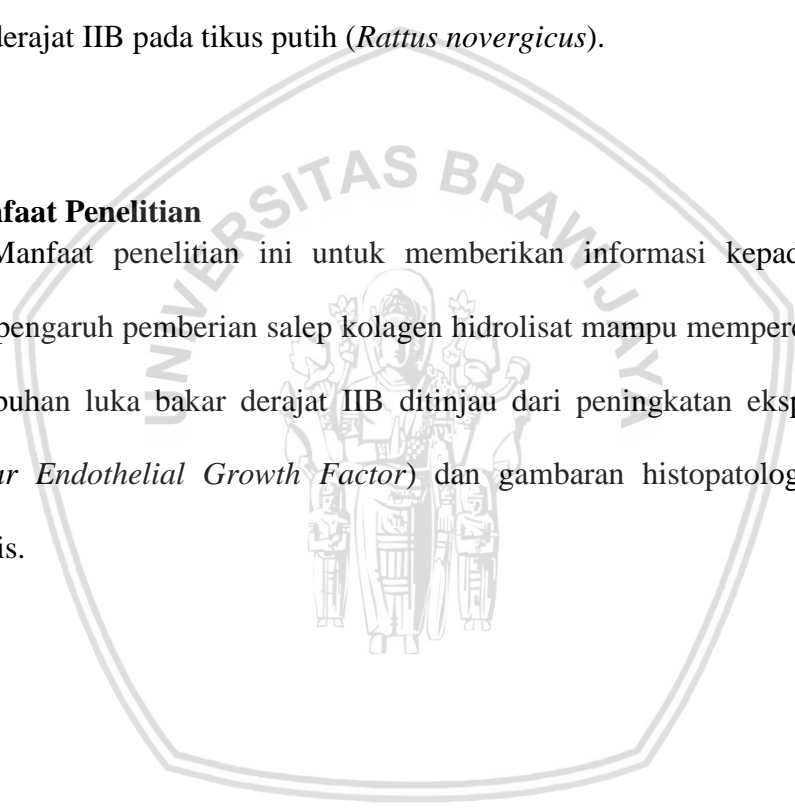
1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan dengan berat badan 150-200 g berumur 8-12 minggu. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang dengan nomor 885-KEP-UB (**Lampiran. 1**).
2. Pembuatan luka bakar derajat IIB menggunakan plat besi ukuran 2x4 cm dengan ketebalan 2 mm. Dichelupkan pada air mendidih dengan suhu 100°C selama 15 menit dan ditempelkan pada bagian punggung tikus selama 15 detik.
3. Kolagen hidrolisat yang digunakan menggunakan produk Gelita yang terlampir (**Lampiran. 2**).
4. Pemberian terapi salep kolagen hidrolisat dengan konsentrasi 5%, 7,5%, dan 10% dilakukan dua kali dalam sehari pada daerah yang mengalami luka bakar selama 10 hari.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian adalah ekspresi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dengan metode Imunohistokimia dan gambaran histopatologi ketebalan epidermis kulit secara kuantitatif menggunakan mikroskop.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh pemberian kolagen hidrolisat terhadap ekspresi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) sebagai penyembuhan luka bakar derajat IIB pada tikus putih (*Rattus novergicus*).
2. Mengetahui pengaruh pemberian salep kolagen hidrolisat terhadap perkembangan ketebalan epidermis sebagai penyembuhan luka bakar derajat IIB pada tikus putih (*Rattus novergicus*).

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini untuk memberikan informasi kepada pembaca tentang pengaruh pemberian salep kolagen hidrolisat mampu mempercepat proses penyembuhan luka bakar derajat IIB ditinjau dari peningkatan ekspresi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dan gambaran histopatologi ketebalan epidermis.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Luka

2.1.1 Luka Bakar

Luka bakar adalah salah satu bentuk kerusakan jaringan dikarenakan kulit bersentuhan langsung dengan sumber panas seperti air mendidih, api, bahan kimia, listrik, dan radiasi (Rohmawati, 2008). Kedalaman dan luas permukaan luka bakar yang terjadi tidak hanya menyebabkan kerusakan pada kulit tetapi juga amat memengaruhi seluruh sistem tubuh (Balqis, 2014). Kulit yang terkena luka bakar akan menyebabkan kerusakan pada bagian epidermis, dermis, bahkan hingga subkutan tergantung dari lamanya kulit kontak dengan penyebab luka serta kedalaman luka. Bila luas luka kurang dari 20% biasanya mekanisme kompensasi tubuh masih bisa mengatasinya, sedangkan luas luka lebih dari 20% akan mengakibatkan syok hipovolemik (Yovita, 2015). Syok hipovolemik adalah ciri yang membedakan luka bakar dengan luka yang lain. Syok hipovolemik terjadi akibat peningkatan permeabilitas kapiler yang menyebabkan plasma bocor keluar dari kapiler ke ruang interstisial. Setelah 48 jam pasca cedera permeabilitas kapiler akan kembali normal (Mawarsari, 2015). Trauma yang diakibatkan oleh luka bakar dapat berdampak pada psikologis dan fisik pasien dengan angka morbiditas dan mortalitas yang cukup tinggi (Lucia dan Elsy. 2014).

Prinsip penanganan terhadap luka bakar adalah menutup luka sesegera mungkin untuk mencegah adanya infeksi dari lingkungan, mengurangi rasa sakit dan reaksi inflamasi dengan pemberian obat luka bakar, dan merangsang pertumbuhan sel-sel pada kulit. Fase penyembuhan luka bakar sama dengan fase

penyembuhan pada luka lain, yaitu fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodelling* (Jansen dan Chemayanti, 2015).

2.1.2 Etiologi Luka Bakar

Penyebab luka bakar dapat berasal dari kontak dengan agen termal, kimiawi, listrik, dan radiasi (Betz, 2009).

a. Termal

Luka bakar dapat disebabkan oleh agen termal kering maupun lembab. Agen termal kering yaitu logam panas ataupun api yang berasal dari kebakaran, sedangkan agen termal lembab berupa air panas atau gas panas. (Grace and Broley, 2007).

b. Kimiawi

Luka bakar kimiawi berasal dari kontak dengan asam, basa, dan muatan organik seperti bitumen. Luka bakar bahan kimia disebabkan oleh asam alkali yang biasa digunakan dalam bidang industri. Zat tersebut dapat menyebabkan perubahan fisik yaitu area tubuh terbakar. (Muscari, 2005; Grace and Broley, 2007).

c. Listrik

Luka bakar listrik dapat disebabkan oleh kabel listrik yang konsleting atau ketika memasukkan objek konduktor ke dalam saluran listrik. Luka bakar akibat sengatan listrik dapat diakibatkan karena *low voltage* dan *high voltage* dan bisa disertai dengan ledakan. Trauma listrik serius berasal dari bahan aliran arus listrik yang melewati jalur organ otot dan vaskuler (Muscari, 2005).

d. Radiasi

Luka bakar radiasi disebabkan oleh paparan sinar matahari langsung dan terapi medis. Awalnya radiasi menyebabkan luka bakar dengan kedalaman sebagian tapi dapat berlanjut ke trauma yang lebih dalam (Muscari, 2005; Grace and Broley, 2007).

2.1.3 Klasifikasi Luka Bakar

Menurut Bishara, *et al.* (2014) berdasarkan derajat kedalamannya maka luka bakar dapat dibedakan menjadi

1. Luka Bakar Derajat I

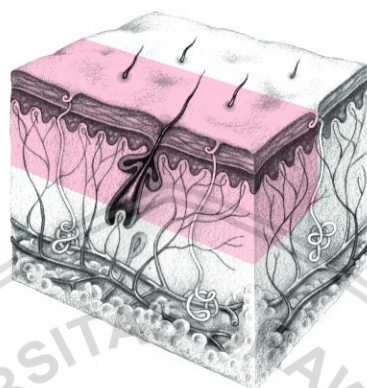
Kerusakan jaringan pada luka bakar derajat 1 meliputi bagian epidermis, sementara bagian dermis masih utuh. Luka bakar derajat 1 ditandai dengan nyeri karena ujung syaraf sensorik teriritasi, kulit kering, hiperemik, dan tidak ditemukannya bula. Kulit sembuh secara spontan dalam waktu 5-10 hari, tidak memerlukan terapi suportif, dan tidak menyisakan jaringan parut. Contohnya adalah luka bakar akibat sengatan matahari (Moenadjat, 2009).



Gambar 2.1. Luka Bakar Derajat I. Kerusakan pada superficial epidermis (Leslie, 2005).

2. Luka Bakar Derajat II

Luka bakar derajat II dibagi menjadi dua berdasarkan kedalamannya yaitu luka bakar derajat IIA dan luka bakar derajat IIB.



Gambar 2.2. Luka Bakar Derajat II. Kerusakan pada bagian epidermis dan sebagian dermis. Ditandai dengan adanya bula (Leslie, 2005).

a. Luka Bakar Derajat IIA atau Dangkal (Superfisial)

Kerusakan yang ditimbulkan akibat cedera ini mengenai seluruh bagian epidermis dan superfisial dari dermis. Apendises kulit seperti folikel rambut, kelenjar keringat, kelenjar sebacea masih utuh. Jarang menyebabkan hipertropik skar dan penyembuhan terjadi dalam waktu 10-14 hari (William dan Hopper, 2007).

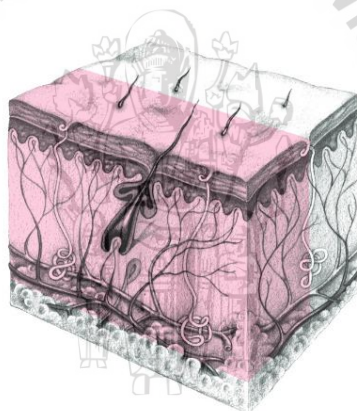
b. Luka Bakar Derajat IIB atau Dalam (Deep)

Luka bakar derajat ini menyebabkan kerusakan pada lapisan epidermis dan $\frac{1}{2}$ hingga $\frac{7}{8}$ bagian dermis kulit. Penyebabnya dapat berupa panas yang berasal dari cairan mendidih, bahan kimia yang ringan hingga berat ataupun kilatan api. Bagian epidermis dan dermis berpisah dan menyebabkan adanya akumulasi cairan diantara keduanya dan terlihat

bagian yang melepuh (Braun, 2007). Proses penyembuhan lebih lama dari luka bakar derajat 2A berlangsung 14 hingga 21 hari bahkan lebih dari satu bulan tergantung apendis kulit yang tersisa.

3. Luka Bakar Derajat 3

Kerusakan jaringan pada luka bakar derajat 3 meliputi seluruh ketebalan dermis dan lapisan yang lebih dalam. Penyembuhan luka dapat berlangsung hingga berbulan-bulan karena tidak ada proses epitelisasi spontan baik dari dasar luka, tepi luka, maupun apendesis kulit (Moenadjat, 2009).



Gambar 2.3. Luka Bakar Derajat III. Kerusakan pada seluruh bagian dermis hingga lapisan yang lebih dalam. Apendis kulit seperti folikel rambut, kelenjar keringat, dan kelenjar sebacea mengalami kerusakan (Leslie, 2005).

2.1.4 Patomekanisme Luka Bakar

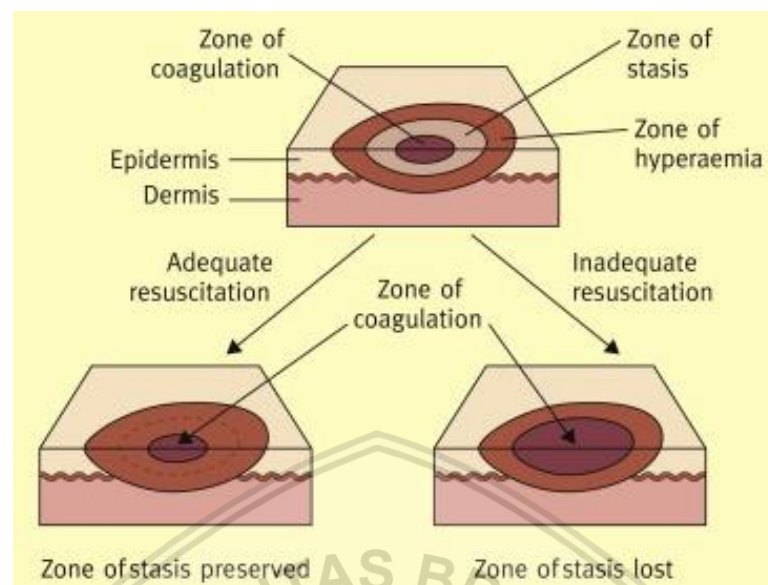
Luka bakar merupakan cedera pada kulit yang diakibatkan oleh panas yang bersentuhan langsung dengan permukaan kulit. Cedera ini dapat merusak lapisan kulit dari epidermis, dermis, hingga subkutan. Kulit yang terpapar sumber panas akan mengalami nekrosis kulit. Menurut Mawarsari (2015) gangguan sistemik terjadi akibat peningkatan permeabilitas kapiler sehingga menyebabkan plasma

bocor keluar dari kapiler ke ruang interstisial. Hilangnya plasma akan menyebabkan penderita mengalami syok hipovolemik. Syok hipovolemik adalah ketidakmampuan jantung mensuplai darah ke seluruh tubuh akibat volume darah yang kurang. Kejadian ini muncul dalam 8 jam pertama dan berlanjut sampai 48 jam. Setelah 48 jam permeabilitas kapiler akan kembali normal. Saat terjadinya kontak antara sumber panas dengan kulit maka tubuh akan merespon untuk mempertahankan homeostasis dengan adanya proses kontraksi, retraksi, dan koagulasi pembuluh darah. Suhu kurang dari 44⁰C dapat ditoleransi oleh tubuh pada periode waktu tertentu tanpa menyebabkan luka bakar (Smeltzer and Bare, 2010).

2.1.5 Zona Kerusakan Jaringan

Menurut Jackson yang dikutip oleh Dida (2011) ada 3 zona konsekutif luka bakar, yaitu zona koagulasi, stasis, dan hiperemi.

- a. Zona koagulasi adalah zona yang langsung bersentuhan dengan sumber panas sehingga menyebabkan jaringan nekrosis dan membentuk jaringan parut. Zona ini disebut juga dengan zona nekrosis. Pada zona ini kehilangan jaringan bersifat *irreversible*.
- b. Zona statis adalah zona yang mengelilingi zona koagulasi. Kerusakan terjadi pada zona ini akibat perubahan endotel pembuluh darah, trombosit, dan eukosit yang diikuti oleh perubahan permeabilitas kapiler.
- c. Zona hiperemi adalah zona terluar dengan cedera sel yang ringan. Sel pada area ini biasanya mengalami kesembuhan secara spontan dan pada sebagian besar kasus akan membaik dalam 7 hingga 10 hari.



Gambar 2.4. Zona kerusakan jaringan (Dominic and Jason. 2014)

2.1.6 Fase Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan luka tidak hanya terbatas pada penutupan pada permukaan kulit tetapi juga meliputi penutupan pembuluh darah yang terkoyak, regenerasi sel, serta pergantian jaringan otot oleh serabut kolagen (Abdurrahmat, 2014). Apabila terjadi luka maka diperlukan penanganan yang tepat untuk mencegah terjadinya komplikasi seperti infeksi sekunder, hematoma, dan perdarahan (Chrysman, 2010). Prinsip dasar penyembuhan luka dibagi menjadi dua, yaitu regenerasi dan perbaikan. Pada regenerasi, jaringan yang rusak diganti proliferasi sel disekitar daerah luka sedangkan pada perbaikan jaringan yang rusak digantikan oleh jaringan granulasi yang membentuk jaringan parut. Secara umum penyembuhan luka meliputi empat fase utama, yaitu fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase *remodeling* (Keast, *et al.*, 2011).

1. Fase Hemostasis

Fase hemostasis terjadi sesaat setelah terjadinya cedera, atau biasa disebut juga dengan fase perdarahan. Fase ini ditandai dengan vasokonstriksi pembuluh darah, sumbat trombosit, dan pembentukan *fibrin plug* sebagai proses koagulasi. Ketika kulit mengalami luka maka tubuh secara normal akan merespon dengan mekanisme kompleks untuk menghentikan perdarahan yang terjadi. Vasokonstriksi pembuluh darah berlangsung \pm 5-10 menit setelah terjadinya luka, agregasi trombosit, dan koagulasi darah. Salah satu komponen aktif yang terlibat dalam fase ini adalah platelet dimana berfungsi untuk menutup kerusakan pada pembuluh darah. Fibrinogen yang ada dalam darah secara cepat mengubah fibrin yang bersama dengan platelet akan membentuk suatu bentukan yang disebut dengan *scab*. Platelet akan melepaskan faktor pembekuan dan berbagai mediator kimia yang dikenal sebagai sitokin dan *growth factor* seperti PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) dan TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*). PDGF akan memicu proses kemotaksis netrofil dan monosit (menginisiasi tahap selanjutnya dari proses penyembuhan luka) serta merangsang perkembangan sel-sel epitel. TGF- β akan menstimulasi pelepasan sitokin lain seperti TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*) dan IL-1(*Interleukin-1*), memperkuat kemotaksis dari fibroblast, dan memodulasi pembentukan kolagen (Keast, *et al.*, 2011; Eming, *et al.*, 2007). Semakin maksimal kerja sitokin maka proses pembersihan luka pun akan semakin baik.

2. Fase Inflamasi

Inflamasi adalah suatu respon terhadap cedera jaringan yang menyebabkan reaksi *vascular* dan umumnya terjadi sampai hari ke lima pasca cedera. Proses tersebut merupakan salah satu mekanisme pertahanan tubuh terhadap benda asing dengan tujuan menghancurkan mikroorganisme yang menginvasi tubuh, menghilangkan jaringan mati untuk mempersiapkan jaringan baru dan mencegah terjadinya infeksi (Widyaningsih, dkk. 2015).

Pada luka bakar terjadi vasodilatasi lokal dan peningkatan permeabilitas kapiler. Proses koagulasi pada luka bakar menyebabkan pelepasan faktor kemotatik seperti peptide fibrin, sedangkan sel mast melepaskan nekrosis tumor, histamine, protease, dan sitokin sehingga terjadi migrasi sel-sel inflamasi. Netrofil adalah sel inflamasi yang pertama kali muncul pada luka dan umumnya akan ditemukan pada dua hari pertama pasca terjadinya cedera. Keberadaan netrofil pada fase ini untuk memfagosit bakteri dan akan masuk ke matriks fibrin dalam persiapan pembentukan jaringan baru. Kemudian neutrofil akan difagositosis oleh makrofag dan akan menjadi sel predominan setelah tiga hari pasca cedera. Makrofag pada proses inflamasi sangat penting karena berperan untuk memproduksi *growth factor* seperti *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endotel growth factor* (VEGF) yang dibutuhkan dalam produksi matriks ekstraseluler oleh fibroblast dan pembentukan neovaskularisasi. Fase inflamasi berlangsung

pendek apabila tidak diikuti dengan kontaminasi atau infeksi yang berat. Akhir dari proses inflamasi akan terbentuk jaringan granulasi yang berwarna kemerahan, lunak, dan granuler (Mawarsari, 2015).

3. Fase Proliferasi

Fase proliferasi berlangsung dari hari ke 6 hingga hari ke 21 pasca cedera. Fase proliferasi ditandai dengan fibroplasia, angiogenesis dan epitelisasi. Pada fase ini fibroblas merupakan tipe sel dominan dan akan memproduksi matriks ekstraseluler untuk migrasi keratinosit. Fibroblas mencerna matriks fibrin dan menggantikannya dengan GAG oleh bantuan MMP. Matriks ekstraseluler akan digantikan oleh kolagen tipe III. Makrofag juga berperan penting dalam fase ini untuk menghasilkan berbagai *growth factor* seperti *Platelet Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).. Peningkatan jumlah jaringan kolagen pada luka berbanding lurus dengan kekuatan renggangan luka (McGavin and Zachary, 2007).

Pembentukan pembuluh darah baru terjadi dengan bantuan protein sekretori yaitu VEGF. VEGF akan menstimulasi sel endotel dalam pembentukan neovaskular melalui proses angiogenesis. Proses angiogenesis, yaitu suatu proses dimana kapiler-kapiler pembuluh darah baru tumbuh atau pembentukan jaringan baru (jaringan granulasi). Proses pembentukan pembuluh darah baru dan jaringan granulasi merupakan proses penting dari fase proliferasi karna jika tidak terbentuk menandakan

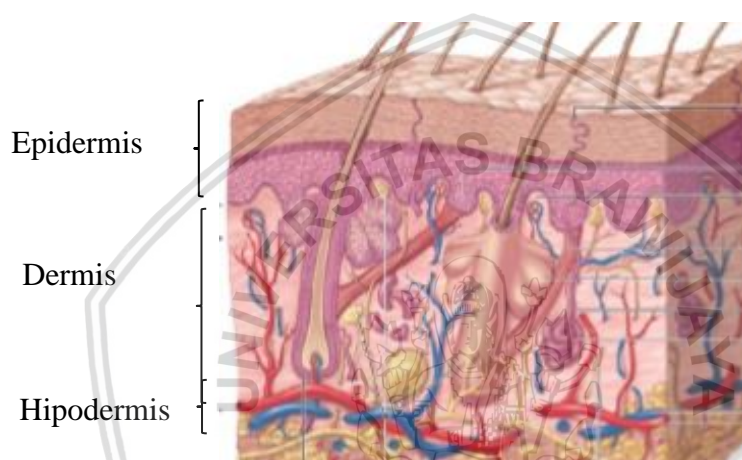
adanya gangguan penyembuhan luka (Gurtner, 2007). Secara klinis akan tampak kemerahan pada luka. Selain itu juga terjadi kontraksi yang berfungsi memfasilitasi penutupan luka. Hasil dari kontraksi akan tampak dimana ukuran luka akan tampak semakin mengecil atau menyatu. Fase proliferasi akan berakhir jika epitel dermis dan lapisan kolagen telah terbentuk, terlihat proses kontraksi dan dipercepat dengan berbagai faktor pertumbuhan yang dibentuk oleh makrofag dan platelet (Argamula, 2008).

4. Fase *Remodelling*

Fase ini berlangsung selama 24-365 hari yang ditandai dengan *remodelling* kolagen untuk meningkatkan kekuatan jaringan. Serabut-serabut kolagen meningkat secara bertahap dan bertambah tebal kemudian disokong oleh proteinase untuk proses perbaikan luka (Sussman, 2007). Pada fase ini dengan bantuan MMP kolagen tipe III akan digantikan oleh kolagen tipe I yang disekresikan oleh fibroblast (Schultz, 2007). Proses *remodelling* memungkinkan kekuatan jaringan baru yang terbentuk mendekati aslinya, pasca tiga minggu pertama setelah terjadinya cedera. Kekuatan maksimal yang bisa dicapai oleh jaringan parut hanya 70% dari jaringan kulit normal (Demidova, *et al.*, 2012).

2.2 Kulit

Bentuk cedera tubuh yang menyebabkan kerusakan jaringan khususnya pada bagian kulit disebut dengan luka. Tingkat keparahan luka akan mempengaruhi lamanya proses penyembuhan luka. Secara umum kulit terbagi atas tiga lapisan utama, yaitu epidermis, dermis, dan hipodermis (**Gambar 2.5**).



Gambar 2.5. Lapisan Kulit (Kalangi, 2013)

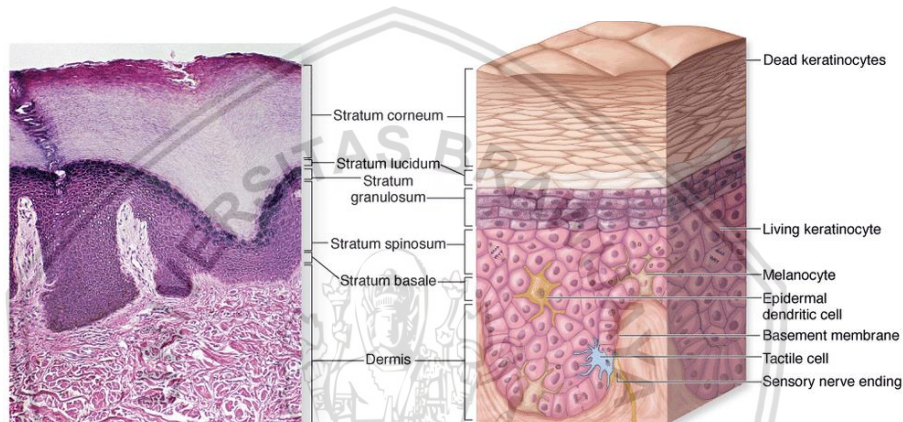
2.2.1 Anatomi Kulit

Kulit merupakan lapisan terluar dari tubuh yang memiliki berbagai fungsi seperti menjaga hemostasis tubuh, sebagai proteksi, ekskresi, dan termoregulasi. Ketebalan kulit bervariasi tergantung lokasinya dengan lapisan paling tebal berada pada telapak tangan dan kaki. Ukuran berat kulit manusia sekitar 16% dari berat tubuh dengan luas 1,5-1,9 m² (Syailindra, 2017). Secara embriologis kulit berasal dari dua lapis yang berbeda. Lapisan luar adalah epidermis yang merupakan lapisan epitel berasal dari ektoderm, sedangkan lapisan dalam yang berasal dari mesoderm adalah dermis atau korium yang merupakan suatu lapisan jaringan ikat (Kalangi, 2013).

2.2.2 Struktur Kulit

a. Epidermis

Epidermis adalah lapisan luar kulit yang tipis dan avaskuler. Secara histologi, epidermis terdiri atas lima lapisan dari luar ke dalam yang dapat dilihat pada (**Gambar 2.6**). Ketebalan epidermis hanya sekitar 5% dari seluruh ketebalan kulit dan terjadi regenerasi setiap 4-6 minggu (Sari, 2015).



Gambar 2.6. Lapisan Epidermis (Kalangi, 2013)

1. Stratum corneum

Stratum corneum merupakan lapisan yang terdiri dari beberapa lapis sel pipih, tidak berinti, dan protoplasmanya telah berubah menjadi zat tanduk (keratinin) yang bisa mengelupas dan berganti. Keratinin adalah sejenis protein yang tidak larut dalam air dan sangat resisten terhadap bahan-bahan kimia.

2. Stratum lucidum

Lapisan ini berada tepat dibawah stratum corneum yang terdiri dari 2-3 lapisan sel gepeng. Merupakan lapisan tipis berupa garis translusen. Lapisan ini tidak tampak pada kulit yang tipis, biasanya terlihat jelas pada bagian telapak tangan dan telapak kaki.

3. Stratum granulosum

Stratum granulosum terdiri dari 2 atau tiga lapis sel karatinosit berbentuk pipih dengan sitoplasma berbutir kasar serta intinya mengkerut dan secara mikroskopik tampak basofilik.

4. Stratum spinosum

Lapisan ini tersusun dari 3-4 lapis sel kuboid dengan inti besar dan oval terletak ditengah. Stratum spinosum ditandai dengan berkas-berkas filament yang memegang peran penting untuk mempertahankan kohesi sel dan melindungi terhadap efek abrasi.

5. Stratum germinativum (lapisan basal)

Stratum germinativum adalah lapisan paling bawah dari epidermis yang terletak berbatasan dengan dermis. Merupakan satu lapis sel yang mengandung melanosit, yaitu sel yang membentuk pigmen melanin.

b. Dermis

Dermis adalah lapisan yang terletak antara epidermis dan sub kutan (hipodermis). Dermis mempunyai banyak jaringan pembuluh darah. dermis juga mengandung beberapa derivat epidermis yaitu folikel rambut, kelenjar keringat, kelenjar, dan kelenjar sebacea. Dermis terdiri dari dua lapis, yaitu

1. Lapisan papilaris

Lapisan tipis yang merupakan bagian atas dari dermis. Lapisan ini terdiri atas jaringan ikat longgar tidak teratur, kapiler, pembuluh darah, dan fibroblast. Fibroblast merupakan sel yang mensintesis kolagen.

2. Lapisan retikuler

Lapisan retikuler adalah lapisan dermis yang lebih dalam dan mengandung pembuluh darah lebih banyak dari lapisan papilaris. Lapisan ini mengandung serabut kolagen yang tebal, fibroblast, makrofag, kelenjar keringat, folikel rambut, dan saraf.

c. Hipodermis

Hipodermis atau lapisan sub kutan adalah lapisan ketiga setelah epidermis dan dermis. Lapisan ini terdiri atas jaringan ikat longgar yang mengandung sel-sel lemak didalamnya. Sel lemak adalah sel bulat, besar ditandai dengan inti terdesak ke pinggir sitoplasma lemak yang bertambah. Berfungsi menunjang suplai darah ke dermis untuk regenerasi. Lapisan ini memisahkan dermis dari lapisan yang berada dibawahnya yaitu fascia, otot, dan tulang.

2.3 Hidrolisat Kolagen

Hidrolisat kolagen disebut juga dengan nama kolagen terhidrolisis atau peptida kolagen. Secara normal hidrolisat kolagen dibuat dengan proses hidrolisis dari kolagen tipe I. Ada beberapa cara untuk mendapatkan hidrolisat kolagen yaitu hidrolisis secara kimiawi, hidrolisis secara enzimatis, maupun kombinasi kimiawi-enzimatis (Mohammad, *et al.*, 2014).

Kolagen berasal dari bahasa Yunani yakni “*cola*” yang berarti lem (*glue*) dan “*genno*” yang berarti kelahiran (*birth*). Hal ini disebabkan karakteristik kolagen yang melekatkan sel untuk membentuk kerangka jaringan dan organ tubuh. Molekul kolagen berdiameter 1,5 nm dengan panjang 280 nm dan berat

molekulnya 290.000 Dalton. Kandungan kolagen berupa tiga rantai polipeptida dengan lebih dari 1000 asam amino dimasing-masing rantainya. Struktur *triple helix* kolagen berasal dari tiga asam amino utama yaitu *glycine*, *proline*, dan *hydroxyproline* (Setyowati dan Wahyuning (2015).

Kolagen merupakan protein terbanyak pada bagian tubuh termasuk kulit dan memiliki peranan penting terhadap proses penyembuhan luka. Kolagen memiliki kemampuan antara lain hemostasis, interaksi dengan trombosit, meningkatkan faktor pertumbuhan dan memacu proses fibroplasia dan proliferasi epidermis (Sussman, 2007). Kolagen memiliki kemampuan kemotaksis terhadap makrofag untuk membantu proses fagositosis. (Westgate, 2012). Menurut Eastoe yang dikutip oleh Haris (2008) bahan dasar dan kelompok hewan yang memiliki sumber kolagen tinggi adalah sebagai berikut:

- a. Tulang : sapi, babi, kelinci, reptile, dan ikan
- b. Kulit : mamalia, reptil, ikan
- c. Tulang rawan : burung/ayam, ikan
- d. Tendon : burung/ayam

Tipe kolagen yang teridentifikasi pada ikan hanya tipe satu dan lima. Kolagen tipe satu terdapat pada kulit, tulang, dan sisik ikan sedangkan kolagen tipe lima terdapat pada jaringan ikat dalam kulit, tendon, dan otot ikan. Jumlah total kolagen meningkat pada awal perbaikan luka (Latifah, 2017). Kolagen berperan penting dalam fase penyembuhan luka karna akan membentuk jaringan baru serta berperan dalam kemotaksis. Platelet yang melekat pada kolagen akan mengeluarkan sinyal kimia berupa *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan

transforming growth factor (TGF- β) untuk memulai proses penyembuhan luka. Kolagen dapat juga membantu agregasi trombosit oleh karena kemampuannya mengikat fibronektin. Trombosit tidak hanya mengawali proses hemostasis tetapi juga melepaskan sejumlah substansi termasuk molekul matriks ekstraseluler. Proses hemostasis disertai dengan vasokonstriksi dan vasodilatasi pembuluh darah.

2.4 Salep Sebagai Terapi Topikal

Untuk mencegah kontaminasi dan mempercepat kesembuhan luka pada permukaan kulit maka dapat diberikan terapi, salah satunya dengan pemberian obat sediaan salep. Salep merupakan bentuk sediaan dengan konsistensi semi solid yang berminyak karna berbahan dasar lemak dan ditujukan untuk pemakaian topikal pada kulit maupun selaput lendir. Tiga fungsi utama dari penggunaan salep yaitu sebagai pelumas pada kulit, sebagai pelindung untuk mencegah kontak permukaan kulit dengan rangsangan dari luar, dan sebagai pembawa substansi obat untuk pengobatan kulit. Agar salep yang dihasilkan berkualitas baik maka ada beberapa syarat yang harus dipenuhi antara lain harus stabil baik secara fisik maupun kimia, warna dan bau tidak berubah selama penyimpanan dan pemakaian, dapat dicampur dengan semua obat, halus dan licin sehingga mudah dalam pengaplikasian pada kulit, dayanya kerja sama baik untuk kulit kering dan berlemak, tidak mengiritasi kulit dan tidak mudah tengik (Kristiana, 2008).

Pemilihan dasar salep yang tepat sangat penting untuk efektivitas yang diinginkan. Sharma (2008) mengelompokkan dasar salep yang digunakan sebagai pembawa menjadi 4 kelompok bagian, yaitu:

a. Dasar Salep Hidrokarbon

Dikenal sebagai dasar salep berlemak, antara lain *vaselin album* dan parafin *liquidum*. *Vaselin album* adalah golongan lemak mineral yang diperoleh dari minyak bumi dengan konsistensi lunak, tidak berbau, dan transparan. Sifat dasar salep hidrokarbon sukar dicuci, tidak mengering, dan tidak berubah dalam waktu yang lama.

b. Dasar Salep Absorpsi

Dasar salep ini berfungsi sebagai emolien. Salep ini dapat dicuci namun kemungkinan bahan sediaan yang tersisa masih ada walaupun telah dicuci dengan air, sehingga sediaan ini tidak cocok untuk sediaan kosmetik.

c. Dasar Salep yang Dapat Dicuci dengan Air

Dasar salep ini mengandung pengemulsi minyak dalam air yang membuatnya bercampur dengan air sehingga mudah dicuci setelah penggunaannya, memiliki tampilan menyerupai krim. Keuntungan dari dasar salep ini mampu meresap cairan serosal yang keluar dalam kondisi dermatologis.

d. Dasar Salep Dasar Larut Dalam Air

Dasar salep ini disebut juga dasar salep tak berlemak yang terdiri dari komponen air. Keuntungan dari dasar salep ini mudah dicuci dengan air setelah penggunaannya.

2.5 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Growth factor adalah suatu substansi berupa protein yang berasal dari tubuh yang memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka. *Growth factor* memiliki kemampuan dalam proliferasi dan diferensiasi sel, pengaturan berbagai proses seluler, dan bekerja sebagai molekul signaling diantara sel. *Growth factor* dapat bekerja dengan cara autokrin (sel target mensekresikan hormone dan akan diterima oleh sel target tersebut), parakrin (sel target mensekresikan hormon dan akan diterima oleh sel target yang lain), dan endokrin (melepaskan hormon secara langsung kedalam aliran darah). Terdapat 8 famili utama dari *growth factor* yang diekspresikan dalam berbagai level oleh sel-sel yang terlibat dalam proses kesembuhan luka, salah satunya VEGF (Transversa dan Sussman, 2001, Mitchell, *et al.*, 2007).

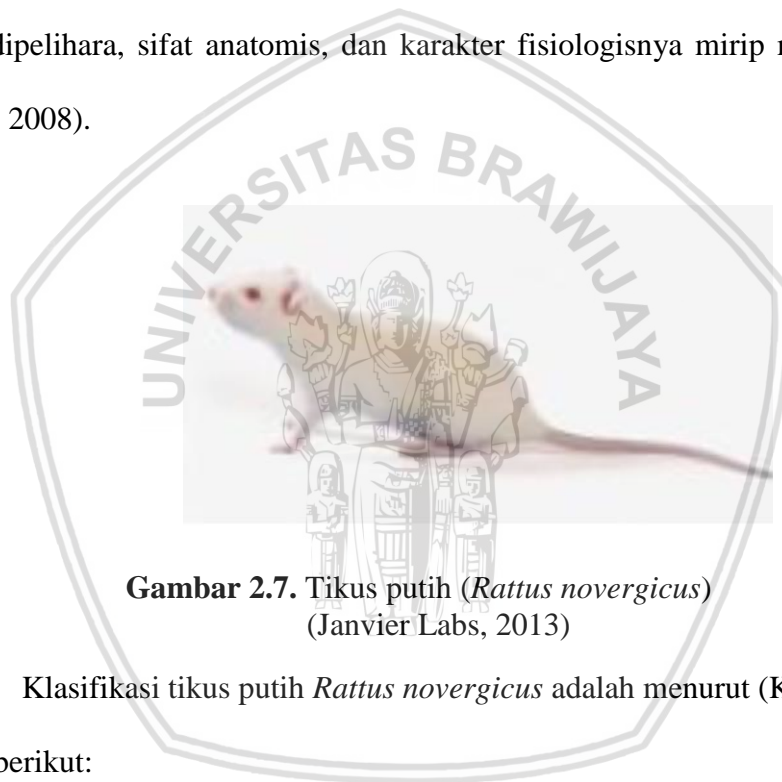
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) merupakan glikoprotein proangiogenik yang mempengaruhi vasopermeabilitas dan angiogenesis. Roskoski (2007) mengklasifikasikan VEGF menjadi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, dan *Placental Growth Factor* (PLGF). VEGF dalam keadaan normal akan diekspresikan dalam jumlah yang bervariasi oleh berbagai jaringan seperti otak,

limpa, hati, dan ginjal. Ekspresi VEGF diinduksi oleh sitokin dan *growth factor* lain seperti TGF- β , KGF, IGF-1, FGF, PDGF, TNF- α , IL-1, dan IL-6.

VEGF disekresikan oleh sel endotel, makrofag, neutrofil, keratinosit, dan fibroblast. Ditemukan pada fase proliferasi dan berperan penting dalam proses angiogenesis. Ekspresi VEGF dalam merangsang angiogenesis melalui peningkatan protease dan migrasi sel endotel. Angiogenesis terdiri dari beberapa tahapan yaitu pelepasan enzim protease dari sel endotel yang teraktivasi, pembentukan pembuluh darah vaskuler, migrasi dan proliferasi sel endotel, pembentukan ECM baru, dan berakhir dengan maturasi pembuluh darah yang baru. Faktor angiogenik akan berdifusi ke jaringan disekitarnya dan kemudian berikatan dengan reseptornya yang kemudian akan memicu aktivasi dari sel endotel. Saat organel sel endotel menerima signal maka akan mulai diproduksi molekul berupa enzim protease yang berperan penting dalam pembentukan ECM yang baru. Proses angiogenesis berfungsi untuk menyediakan nutrisi yang dibutuhkan oleh jaringan luka dan berperan dalam perbaikan struktur melalui pembentukan jaringan granula. Faktor angiogenik seperti VEGF akan menjadi sel dominan yang meningkat regulasinya saat proses penyembuhan luka. Penyembuhan luka ditandai dengan banyaknya jaringan granulasi teravaskularisasi untuk percepatan proliferasi. Kegagalan penyembuhan luka dapat diakibatkan oleh kerusakan proses angiogenesis.

2.6 Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Penggunaan tikus sebagai model hewan coba untuk penelitian di laboratorium dimulai pada abad ke-19 di Prancis dan Inggris. Penelitian terbaru memastikan bahwa strain tikus yang digunakan berasal dari seleksi liar tikus *Rattus novergicus* (Koolhaas, 2010). Tikus putih *Rattus novergicus* digunakan sebagai hewan percobaan karena murah, umumnya lebih cepat berkembang biak, mudah dipelihara, sifat anatomis, dan karakter fisiologisnya mirip mamalia lain (Pribadi, 2008).



Gambar 2.7. Tikus putih (*Rattus novergicus*)
(Janvier Labs, 2013)

Klasifikasi tikus putih *Rattus novergicus* adalah menurut (Krinke, 2000) sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub Phylum	: Vertebrata
Class	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Familia	: Muridae

Genus : *Rattus*

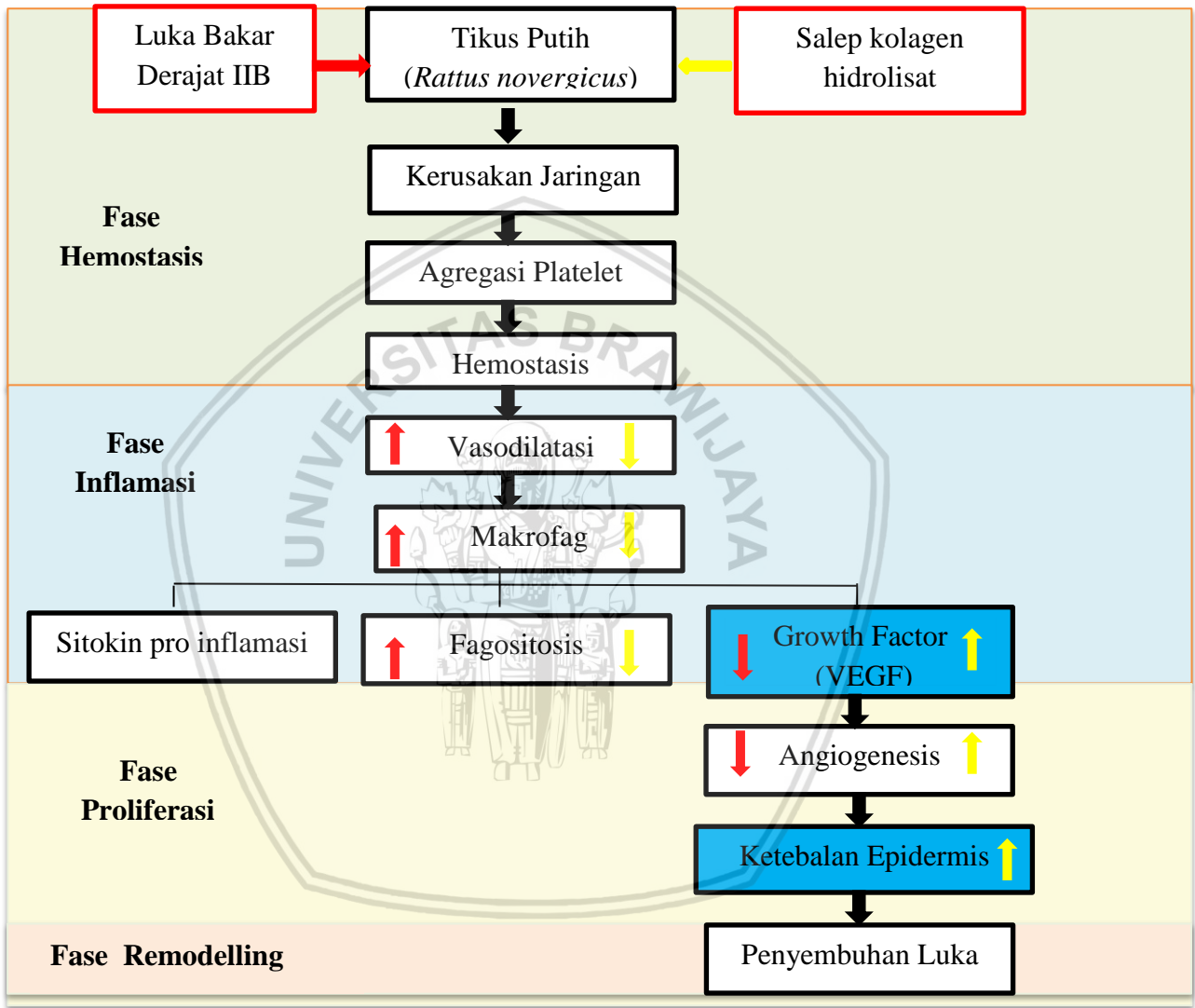
Spesies : *Rattus novergicus*

Tikus putih *Rattus novergicus* memiliki sepasang gigi seri berbentuk pahat yang digunakan untuk mengerat. mempunyai rambut berwarna putih, dan mata yang merah, panjang tubuh total 440mm, panjang ekor 250 mm dan bobot tikus pada usia dewasa sekitar 250-500 g (Potter, 2007). Bulu tikus yang tidak tebal menjadi keuntungan dalam penelitian dengan perlakuan pada kulit.



BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan gambar :



: Variabel bebas



: Variabel terikat



: Stimulasi



: Efek luka bakar



: Efek terapi

Gambar 3.1. Kerangka Konsep Penelitian

Hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan diinduksi menggunakan luka bakar derajat IIB. Luka bakar derajat IIB merupakan suatu bentuk cedera kulit yang mengakibatkan kerusakan pada seluruh epidermis dan hampir seluruh bagian dermis. Proses penyembuhan akan dimulai setelah terjadinya luka untuk memperbaiki kerusakan jaringan. Reaksi tersebut merupakan respon tubuh normal untuk mengganti jaringan yang rusak, memperbaiki struktur kekuatan dan fungsinya melalui empat tahapan proses penyembuhan luka, yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodelling*. Kerusakan jaringan yang terjadi menyebabkan platelet berkumpul pada daerah permukaan luka untuk mencegah tubuh kehilangan banyak darah saat cedera. Fase hemostasis ditandai dengan vasokonstriksi pembuluh darah, sumbat trombosit, dan pembentukan *fibrin plug* sebagai proses koagulasi.

Fase selanjutnya inflamasi yang ditandai dengan vasodilatasi pembuluh darah. Fase inflamasi diawali dengan migrasi neutrofil ke daerah luka. Neutrofil akan mengeluarkan protease untuk mendegradasi matriks ekstraseluler yang tersisa. Fungsi neutrofil pada fase ini untuk memfagositosis jaringan mati dan mencegah terjadinya infeksi dari bakteri patogen. Neutrofil akan difagosit oleh makrofag dan menjadi sel dominan. Selain fungsi fagositosis makrofag juga berperan dalam menghasilkan berbagai elemen sitokin pro inflamasi seperti TNF- α dan IL-1, IL-6, dan IL-8. Setelah fase inflamasi selesai akan dilanjutkan dengan fase proliferasi yang ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi, angiogenesis, dan re-epitelisasi. Makrofag akan menghasilkan berbagai *growth factor* salah satunya VEGF. VEGF merupakan faktor pro angiogenik yang

berperan dalam proses angiogenesis (pembentukan pembuluh kapiler darah baru). Angiogenesis terdiri dari beberapa tahap antara lain pemecahan membran basalis oleh enzim protease, migrasi, proliferasi, dan diferensiasi sel endotel. Re-epitelisasi adalah proses perbaikan jaringan epidermis untuk menutup luka dan terdiri dari migrasi dan proliferasi keratinosit. Akhir dari fase ini *remodelling* yang terjadi hingga bertahun dan berfungsi untuk meningkatkan kekuatan renggangan luka.

Pemberian terapi salep kolagen hidrolisat dengan zat aktif kolagen yang berasal dari ikan adalah satu cara untuk mempercepat proses penyembuhan pada kejadian luka bakar. Kolagen berperan penting pada proses penyembuhan luka karena memiliki kemampuan interaksi dengan trombosit, kemotaksis monosit, meningkatkan faktor pertumbuhan, dan proliferasi epidermis (Novriansyah, 2008). Kolagen bersama dengan trombosit akan bekerja pada fase hemostasis. Kolagen membantu agregasi trombosit oleh karena kemampuannya mengikat fibronectin, dimana fibronectin akan merangsang terjadinya migrasi sel ke dalam luka. Kolagen juga memiliki kemampuan kemotaksis terhadap monosit. Monosit seperti makrofag akan memfagosit bakteri patogen dan membersihkan debris pada daerah luka. Peningkatan jumlah makrofag akan meningkatkan substansi faktor pertumbuhan seperti VEGF yang berperan pada fase angiogenesis. Kolagen juga berperan dalam proliferasi epidermis melalui proliferasi sel epitel kedaerah luka. Peningkatan ekspresi VEGF dan ketebalan epidermis menandakan semakin baiknya proses penyembuhan luka.

3.2 Hipotesa Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Terapi salep kolagen hidrolisat mampu meningkatkan kadar ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada luka bakar derajat II B tikus (*Rattus novergicus*).
2. Terapi salep kolagen hidrolisat mampu meningkatkan ketebalan epidermis pada luka bakar derajat II B tikus (*Rattus novergicus*).



BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2018 hingga April 2018. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, pembuatan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium FAAL Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Kessima Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Hewan model menggunakan tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) berumur 8-12 minggu. Bobot badan tikus 150-200 g. Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008).

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

t : Jumlah kelompok perlakuan

$$3n-3 \geq 15$$

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 4 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan kurang lebih 6 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 24 ekor hewan coba.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL digunakan apabila ragam satuan percobaan yang digunakan seragam atau homogen. Empat kelompok perlakuan yakni terapi burnazin, perlakuan 1, 2, dan 3. Terapi burnazin merupakan kelompok terapi yang diberikan luka bakar dan diterapi menggunakan salep burnazin. P (1) merupakan kelompok terapi yang diberikan luka bakar dan terapi menggunakan salep kolagen konsentrasi 5%. P (2) merupakan kelompok terapi yang diberikan luka bakar dan terapi menggunakan salep kolagen konsentrasi 7,5%. P (3) merupakan kelompok terapi yang diberikan luka bakar dan terapi menggunakan salep kolagen konsentrasi 10%. Terapi diberikan dua kali sehari selama 10 hari.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan
Terapi Burnazin	Luka bakar derajat IIB + salep burnazin
P1 (Perlakuan 1)	Luka bakar derajat IIB + salep kolagen hidrolisat konsentrasi 5% terapi
P2 (Perlakuan 2)	Luka bakar derajat IIB + salep kolagen hidrolisat konsentrasi 7,5%
P3 (Perlakuan 3)	Luka bakar derajat IIB + salep kolagen hidrolisat konsentrasi 10%

4.4 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, kandang tikus, *underpad*, tempat pakan, botol minum tikus, *waterbath*, mortir, timbangan digital, *sprit* 1cc, plat besi ukuran 4 x 2 cm dengan ketebalan 2 mm, *glove*, masker, kassa, scalpel, blade, gunting tajam-tajam, gunting tajam-tumpul, dan pinset.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus novergicus*), pakan dan minuman tikus, salep burnazin, kolagen hidrolisat, *Vaselin album*, *ketamine*, *xylazine*, alkohol, NaCl fisiologis 0,9%, formalin 10%, PBS, larutan xilol, ethanol 70%, 80%, 90%, 95%, antibodi VEGF, *Diamino benzidine*, pewarna hematoksilin-eosin.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Konsentrasi salep kolagen hidrolisat

Variabel terikat : Ekspresi VEGF dan ketebalan epidermis

Variabel kontrol : Tikus (*Rattus novergicus*), luka bakar derajat IIB, jenis kelamin, berat badan, umur, suhu, pakan, dan kandang

4.6 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan coba
2. Pembuatan salep kolagen hidrolisat

3. Perlakuan luka bakar derajat IIB pada hewan coba
4. Pemberian terapi salep kolagen hidrolisat
5. Euthanasi dan pengambilan kulit
6. Pembuatan preparat histopatologi kulit dengan pewarnaan HE
7. Tahap pengamatan ekspresi VEGF dengan Imunohistokimia (IHK)
8. Tahap perhitungan ketebalan epidermis
9. Analisa data

4.7 Prosedur kerja

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus dikandangkan dalam kandang ukuran 17,5cm x 23,75cm. Kandang terbuat dari bahan plastik dengan tutup terbuat dari rangka kawat. Kandang disekat menjadi empat bagian dan alas kandang menggunakan *underpad*. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Tikus diadaptasi selama tujuh hari dengan pemberian pakan basal pada semua tikus. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor tikus. Komposisi ransum yang diberikan yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air.

4.7.2 Pembuatan Salep Kolagen Hidrolisat

Salep dibuat dengan bahan dasar hidrokarbon yaitu *Vaselin album*. Dasar salep hidrokarbon memiliki beberapa keuntungan seperti bertahan lama pada kulit, daya absorpsi tinggi jika dibandingkan dengan dasar salep yang lain serta sukar dicuci dengan air (Nareswari, 2013). Pembuatan salep kolagen hidrolisat diawali dengan menyiapkan bahan yang akan digunakan antara lain serbuk kolagen hidrolisat dan *Vaselin album*.

Penelitian ini menggunakan kolagen hidrolisat yang dibuat dalam sediaan salep berbagai konsentrasi, yaitu 5%, 7,5 %, dan 10%. Masing-masing bahan ditimbang untuk menyesuaikan ke variasi konsentrasi. Basis salep dan kolagen hidrolisat yang telah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam wadah plastik dan dicampur hingga rata dengan menggunakan mortar. Sediaan salep kemudian disimpan di pot salep dan ditutup rapat. Salep disimpan di tempat yang kering dan terhindar dari sinar matahari.

4.7.3 Perlakuan Luka Bakar Derajat IIB Pada Hewan Coba

Seluruh tikus (24 ekor) yang sudah diadaptasikan, pada hari pertama penelitian dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Masing-masing tikus diberi tanda atau label pada ekornya dengan spidol tahan air sesuai kelompoknya. Rambut tikus sekitar daerah yang akan diinduksi luka bakar dibersihkan dengan kapas beralkohol 70%. Dilakukan anestesi pada sekitar lokasi pembuatan luka bakar dengan menggunakan kombinasi *ketamine HCL* (konsentrasi 100mg/ml) dan *xylazine* (konsentrasi

20mg/ml) secara intramuskular. Pembuatan luka bakar derajat IIB menggunakan plat besi berukuran 2 x 4cm dengan ketebalan 2mm, dicelupkan pada air mendidih suhu 100°C selama 15 menit dan ditempelkan pada punggung tikus selama 15 detik.

4.7.4 Pemberian Terapi Salep Kolagen Hidrolisat

Pemberian terapi dilakukan dua hari sekali secara topikal dengan cara mengoleskan salep kulit kolagen hidrolisat pada area yang dilakukan luka bakar dengan konsentrasi bertingkat yaitu 5% pada kelompok P1, 7,5% pada kelompok tikus P2, dan 10% pada kelompok P3.

4.7.5 Euthanasi dan Pengambilan Kulit

Pengambilan jaringan kulit pada hewan coba tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) dilakukan pada hari ke 18. Langkah awal yang dilakukan yaitu euthanasi dengan cara dislokasi cervicalis. Kemudian dilakukan pengambilan jaringan pada bagian yang diberi perlukaan menggunakan *scalpel-blade* dengan mengikutsertakan jaringan kulit normal kira-kira 0,5 cm dari tepi luka. Jaringan yang diperoleh kemudian dibilas menggunakan NaCl fisiologis 0,9% dan kemudian dimasukkan ke dalam larutan pengawet formalin 10%. Selanjutnya diproses untuk dibuat sediaan mikroskopis.

4.7.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit dengan Pewarnaan HE

Kulit yang telah diambil selanjutnya dibuat preparat histopatologi yang terdiri atas fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan pada gelas objek, dan pewarnaan HE. Jaringan kulit

difiksasi menggunakan alkohol 10% dengan tujuan untuk mencegah kerusakan jaringan. Tahap selanjutnya dilakukan proses dehidrasi alkohol menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat mulai dari 70% selama 30 menit, 80% selama 30 menit, 90% selama 30 menit, dan 95% selama 30 menit. Kulit yang telah melewati proses dehidrasi selanjutnya melalui proses penjernihan dengan cara memasukkan jaringan kedalam larutan penjernih yaitu xilol I,II, III masing-masing selama 30 menit. Kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C selama 90 menit.

Proses *embedding* dilakukan dengan cara mencelupkan sediaan kedalam alat pencetak yang berisi parafin cair. Ditunggu dan dibiarkan beberapa saat hingga parafin memadat. Pembuatan preparat dilakukan dengan memasukkan hasil *embedding* pada penjepit (*block holder*). Selanjutnya tahap *sectioning*, yaitu tahap pemotongan jaringan yang dilakukan dengan menggunakan mikrotom. Blok-blok parafin dipotong tipis dengan ketebalan $\pm 4-5 \mu\text{m}$. Hasil potongan yang berbentuk pita (*ribbon*) dibentangkan diatas air hangat suhu 38-40°C dan langsung diangkat. Tujuan dari tahap ini agar pita parafin berkembang dengan baik dan tidak terlipat akibat proses pemotongan. Selanjutnya pita parafin terpilih diletakkan diatas gelas objek sampai benar-benar kering kemudin preparat disimpan dalam inkubator pada suh 38-40°C untuk selanjutnya dilakukan pewarnaan.

Pewarnaan HE (*Haematoxylin and Eosin*) menggunakan zat pewarna hematoksilin dan eosin. Zat pewarna hematoksilin berfungsi untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik), sedangkan zat pewarna eosin yang merupakan

counterstaining hematoksin berfungsi untuk memberi warna merah muda pada sitoplasma sel dan jaringan penyangga. Tahapan pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi yang tujuannya untuk menghilangkan atau melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan. Sayatan dimasukkan ke dalam oven 70°C selama 1 jam, kemudian direndam menggunakan xilol I, II, dan III masing-masing 5 menit. Selanjutnya proses rehidrasi dengan menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, dan 95% selama 2 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Selanjutnya sediaan diwarnai dengan zat pewarna hematoksin selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 20 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Kemudian dilakukan pewarnaan kembali dengan menggunakan zat warna eosin selama 1 menit dan dicuci kembali selama 10 menit menggunakan air mengalir. Setelah seluruh sediaan terwarnai maka dilanjutkan dengan proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, dan 95% masing-masing selama 2 menit. Setelah itu dilakukan proses *clearing* dengan xilol I, II, dan III selama 3 menit. Proses terakhir dilakukan *mounting* (perekatan) menggunakan entellan serta ditutup menggunakan *coverglass* (Balqis dkk., 2014).

4.7.7 Ekspresi VEGF dengan Metode Imunohistokimia

Metode pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman slide preparat pada xilol (I, II, dan III) dan etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%) dan aquades. Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 1x15 menit. Selanjutnya ditetesi dengan 3 % H₂O₂ selama 20 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan di blok dengan

5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) selama 1 jam. Kemudian slide preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *anti mouse* VEGF selama 1 jam dengan suhu ruang dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali selama 1 jam dengan suhu ruang. Berikutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder *rabbit anti rat labeled biotin* selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali.

Slide preparat ditetesi dengan Strep Avidin Horse Radish Peroxidase (SA-HRP) dan diinkubasi selama 40 menit. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan *Diamano Benzidine* (DAB) dan diinkubasi selama 10 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit. Dicuci dengan air mengalir. Dibilas menggunakan aquades dan dikeringkan. Terakhir, slide dimounting dengan entellan dan ditutup dengan *coverglass*.

Pengamatan ekspresi VEGF dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x dengan lima bidang pandang pengamatan. Setelah itu hasil pengamatan di foto. Hasil foto dari mikroskop diproses menggunakan software *ImmunoRatio* untuk mengamati peningkatan ekspresi VEGF yang ditandai dengan peningkatan presentasi luas daerah yang terwarnai. Ekspresi VEGF akan terlihat berwarna coklat tua pada sitoplasma maupun permukaan sel endotel (Ferdinant dan Imam, 2013).

4.7.8 Tahap perhitungan ketebalan epidermis

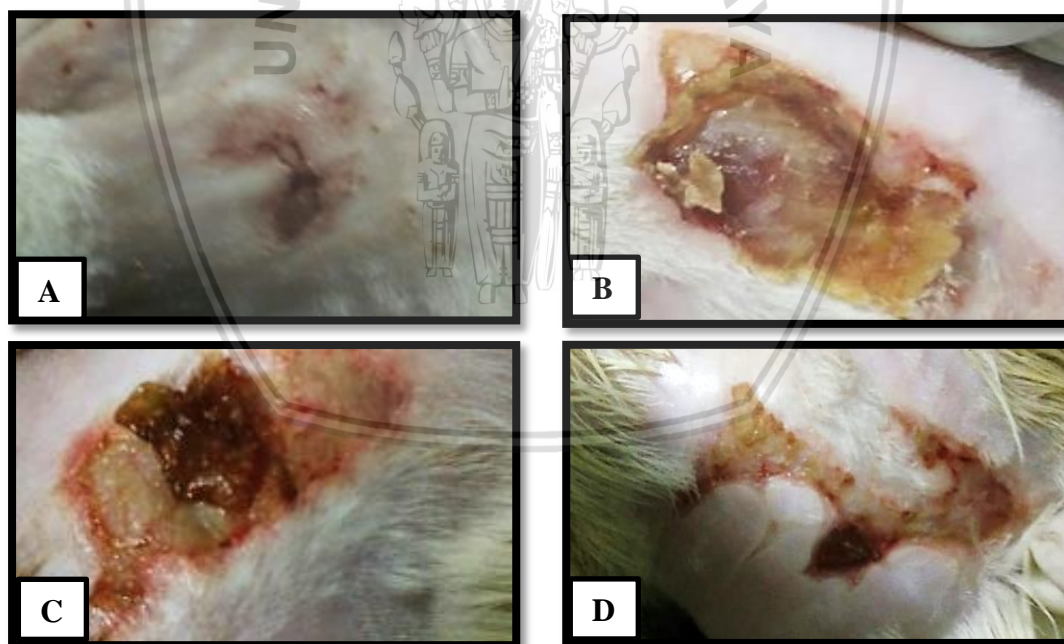
Epidermis terdiri dari lima lapis, yaitu stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum germinativum. Ketebalan epidermis diukur secara tegak lurus mulai dari stratum corneum hingga stratum germinativum dalam satuan mikrometer. Pengukuran ketebalan epidermis dengan Optilab® perbesaran 400x dan menggunakan program ImageRaster® dengan perbesaran foto 400x.

4.7.9 Analisa data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi VEGF dan ketebalan epidermis dianalisis secara kuantitatif menggunakan Microsoft Excel dan SPSS for windows dengan analisis statistik ragam *one way* ANOVA dan uji lanjutan dengan uji Tukey $\alpha=0,05$. ANOVA digunakan untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok (Kusriningrum, 2008).

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

Luka bakar adalah suatu bentuk cedera kulit yang diakibatkan paparan langsung benda panas seperti air mendidih, api, radiasi maupun sengatan listrik. Luka bakar derajat IIB merusak seluruh lapisan epidermis dan $\frac{1}{2}$ hingga $\frac{7}{8}$ bagian dermis. Hewan coba tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) diinduksi luka bakar pada bagian punggung menggunakan plat besi ukuran 4x2cm dengan ketebalan 2mm dan diberikan terapi menggunakan salep kolagen hidrolisat selama 10 hari. Gambaran makroskopis jaringan kulit pada kelompok terapi burnazin, kelompok terapi 1, kelompok terapi 2, dan kelompok terapi 3 yang dilakukan induksi luka bakar derajat IIB dapat dilihat pada **Gambar 5.1**



Gambar 5.1. Gambaran makroskopis kulit tikus putih (*Rattus novergicus*) pasca induksi luka bakar derajat IIB pada hari ke 10 (Dokumentasi pribadi)

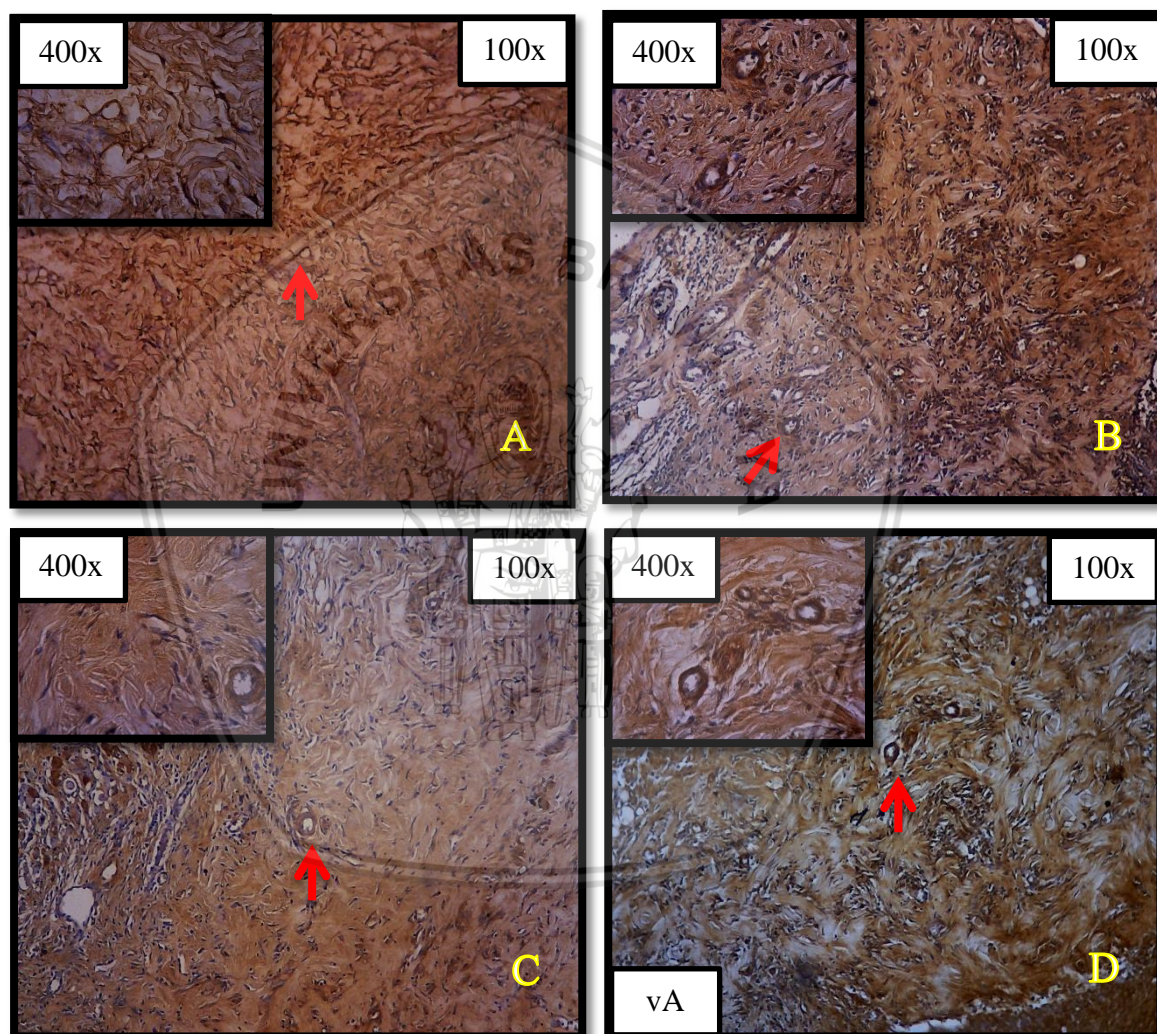
Keterangan : (A) terapi burnazin (B) terapi salep kolagen hidrolisat 5% (P1), (C) terapi salep kolagen hidrolisat 7,5% (P2), (D) terapi salep kolagen hidro lisat 10% (P3).

Berdasarkan gambaran makroskopis luka bakar derajat IIB pada hari ke 10 menunjukkan kesembuhan yang berbeda-beda pada setiap kelompok perlakuan. Kelompok terapi burnazin (**Gambar 5.1 A**) yang diterapi menggunakan salep burnazin menunjukkan pada luka telah tampak pengecilan dari luas luka bakar dan jaringan di sekitar luka mulai ditumbuhi bulu, keropeng pada bagian luka seluruhnya sudah terlepas. Salep burnazin dengan kandungan *silver* dan *sulfadiazine* memiliki spektrum luas terhadap bakteri gram negatif, sebagian besar gram positif, dan beberapa jamur sehingga jika infeksi dari bakteri patogen dapat dicegah maka proses kesembuhan luka semakin cepat (Gauglitz, *et al.*, 2012). Kelompok terapi salep kolagen hidrolisat 5% (**Gambar 5.1 B**) tidak terlihat adanya pengecilan dari luas luka, pertumbuhan rambut tampak hanya pada daerah tepi luka karena rambut yang baru tumbuh ikut tercabut saat lepasnya jaringan. Kelompok terapi salep kolagen hidrolisat 7,5% (**Gambar 5.1 C**) tampak sisa pembentukan jaringan mati namun daerah disekitar perlukaan belum ditumbuhi bulu, dan ukuran luka belum mulai mengecil. Kelompok terapi salep kolagen hidrolisat 10% (**Gambar 5.1 D**) menunjukkan hasil yang hampir sama dengan kelompok terapi burnazin dimana jaringan mati sudah terlepas seluruhnya yang menunjukkan kulit sehat baru, luas luka sudah mulai mengecil, dan pertumbuhan rambut tampak di daerah sekitar luka. Jika dibandingkan luas luka pada kelompok terapi burnazin dan terapi 10% maka ukuran luka pada kelompok terapi cenderung lebih luas, hal ini diakibatkan oleh rangsangan kimia seperti histamin. Histamin dihasilkan oleh sel mast yang mensensitisasi ujung serabut saraf C yang berada pada bagian superficial kulit. Saat impuls diterima oleh serabut saraf C maka akan

diteruskan menuju medulla spinalis kemudian naik ke talamus untuk dinterpretasikan sebagai sensasi gatal. Akibatnya hewan cenderung menggaruk daerah luka yang dapat memperlama proses kesembuhan (Lie,2011).

5.1 Pengaruh Pemberian Salep Kolagen Hidrolisat Terhadap Ekspresi VEGF

(*Vascular Endothelial Growth Factor*) Pada Luka Bakar Derajat IIB



Gambar 5.2 Ekspresi VEGF pada sel endotel jaringan kulit tikus (*Rattus novergicus*) dengan metode Immunohistokimia.

Keterangan: Terapi burnazincin (A), (P1) tikus dengan terapi salep kolagen hidrolisat konsentrasi 5% (B), P(2) tikus dengan terapi salep kolagen hidrolisat konsentrasi 7,5% (C), P(3) tikus dengan terapi salep kolagen hidrolisat konsentrasi 10% (D).

Berdasarkan hasil ekspresi pada kelompok terapi burnazin **Gambar 5.2 A** menunjukkan adanya warna coklat pada sitoplasma sel endotel yang berarti terdapat ekspresi VEGF. Kelompok terapi burnazin merupakan kelompok yang diinduksi luka bakar derajat IIB dan diterapi menggunakan salep burnazin. Salep burnazin dengan kandungan *silver sulfadiazine* merupakan obat topikal *gold standard* yang diberikan untuk perawatan luka bakar. Salep ini merupakan golongan sulfonamid yang memiliki sifat antibakteri dengan cara berkompetisi dengan substrat PABA untuk sintesis enzim dihidropteroat sehingga mencegah sintesis asam folat bakteri. Selain itu salep ini juga mampu merangsang sel seperti makrofag untuk menghasilkan sitokin dan *growth factor* untuk mempercepat proses penyembuhan luka (Faudi, dkk. 2015).

Pengukuran persentase hasil ekspresi VEGF dilakukan dengan menggunakan *software ImmunoRatio* dan didapatkan jumlah rata-rata ekspresi yang dapat dilihat pada **Tabel 5.1**. Data yang diperoleh kemudian diuji menggunakan uji normalitas dan homogenitas. Jika hasil normalitas dan homogenitas $>0,05$ maka dilakukan uji statistik dengan menggunakan *one way ANOVA* dan dilakukan uji lanjutan uji *Tukey* dengan $\alpha=5\%$ dengan hasil uji statistik terdapat pada **Lampiran 8**.

Hasil analisis menggunakan uji Beda Nyata Jujur terhadap kadar ekspresi VEGF pada hari ke 10 kelompok terapi burnazin memiliki rata-rata ekspresi $56,37 \pm 0,52$ yang digunakan sebagai standar untuk kelompok perlakuan. Ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan 1 (5%) berbeda nyata dengan

kelompok perlakuan 2 (7,5%), perlakuan 3 (10%) dan kelompok terapi burnazin dengan rata-rata ekspresi $36,51 \pm 1,36$ (**Tabel 5.1**)

Tabel 5.2 Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi VEGF (%) (Rata-rata \pm SD)
Terapi Burnazin	$56,37 \pm 0,52^c$
Perlakuan 1 (B)	$36,51 \pm 1,36^a$
Perlakuan 2 (C)	$46,38 \pm 1,08^b$
Perlakuan 3 (D)	$55,63 \pm 0,94^c$

Keterangan: Perbedaan notasi a,b,c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan

Pada kelompok perlakuan 1 dan 2 kadar ekspresi VEGF menunjukkan bahwa luka belum mengalami kesembuhan. Hal ini ditunjukkan bahwa kadar ekspresinya berbeda nyata dengan kelompok kontrol yang digunakan sebagai standar ekspresi VEGF. Pada gambaran makroskopis kondisi luka masih dalam tahap inflamasi dimana daerah pada luka masih terlihat kemerahan. Kelompok tikus dengan terapi salep kolagen hidrolisat 5% menunjukkan rata-rata sebesar $36,51 \pm 1,36$. Kelompok tikus dengan terapi salep kolagen hidrolisat 7,5% menunjukkan rata-rata ekspresi sebesar $46,38 \pm 1,08$. Lamanya proses penyembuhan luka dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kontaminasi, sisa jaringan mati, dan kurangnya pasokan oksigen (Guo and DiPietro, 2010). Selain itu proses kesembuhan luka juga dipengaruhi konsentrasi obat dimana konsentrasi pada kelompok perlakuan 1 dan 2 lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan 3. Efrizal dan Rahayu (2014) menyebutkan bahwa lamanya penutupan luka juga dipengaruhi oleh konsentrasi obat. Konsentrasi salep 5% dan 7,5% memiliki zat aktif yang berjumlah sedikit sehingga walaupun terdifusi dengan baik akan tetapi jumlah zat aktif yang terkandung tidak mencukupi untuk penyembuhan luka sehingga proses penyembuhan menjadi lebih lama. Menurut

Sinko (2006) viskositas juga mempengaruhi lama kesembuhan dimana semakin besar viskositas suatu zat maka difusi obat semakin menurun karena pelepasan obat dari basis semakin berkurang. Nilai viskositas dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti basis, ukuran partikel, dan konsentrasi zat aktif.

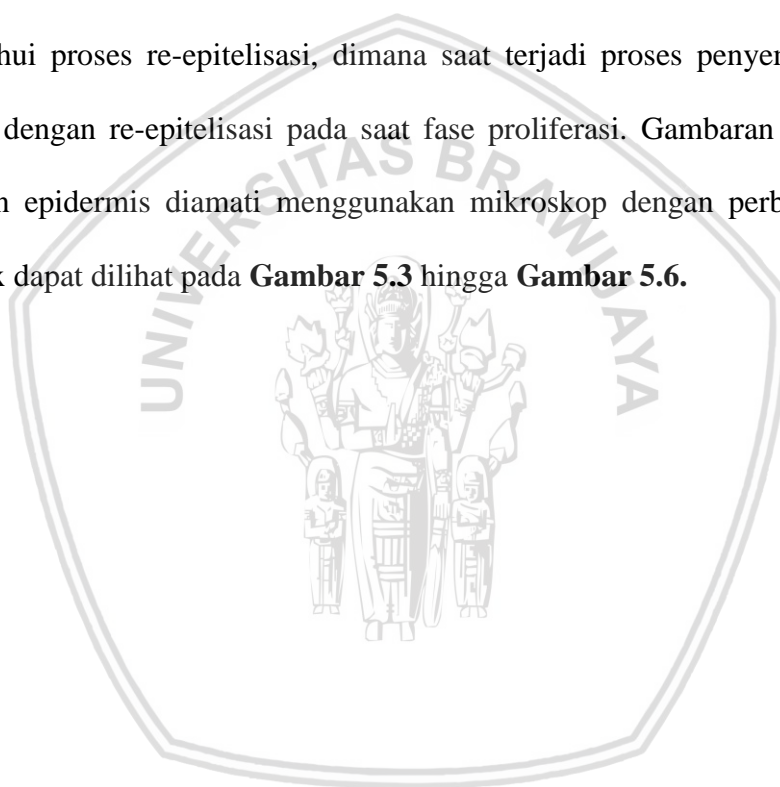
Pada kelompok perlakuan 3 (10%) menunjukkan rata-rata ekspresi sebesar $55,63 \pm 0,94$ tidak berbeda nyata dengan kelompok terapi burnazin yang menunjukkan bahwa proses penyembuhan luka dalam fase proliferasi. Hal ini disebabkan karena salep kolagen hidrolisat dengan kandungan senyawa kolagen mempercepat proses kesembuhan luka oleh karena kemampuannya mengikat fibronektin. Selain itu kolagen juga bersifat kemotaksis terhadap makrofag untuk membantu proses fagositosis dan menghasilkan growth factor salah satunya VEGF yang akan menginisiasi pembentukan pembuluh darah baru.

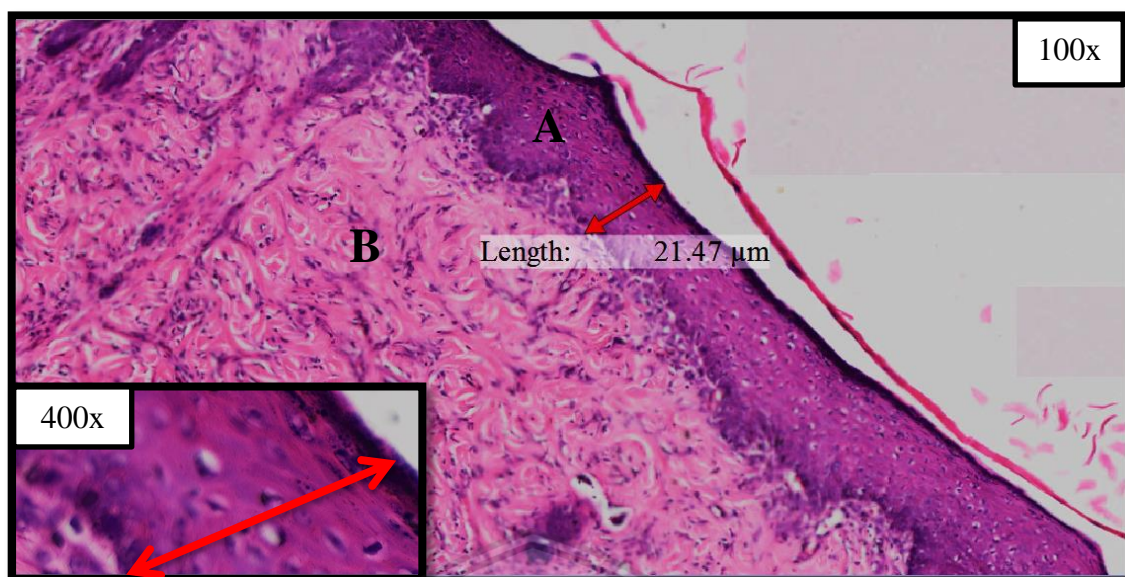
Berdasarkan penjelasan dan hasil analisa statistik menggunakan uji *one way* ANOVA dan uji lanjutan Uji Beda Nyata Jujur diatas maka dapat disimpulkan bahwa terapi menggunakan salep kolagen hidrolisat konsentrasi 10% merupakan terapi dengan konsentrasi optimal, karena menunjukkan peningkatan hasil ekspresi VEGF.

5.2 Pengaruh Pemberian Salep Kolagen Hidrolisat Terhadap Ketebalan Epidermis Pada Luka Bakar Derajat IIB

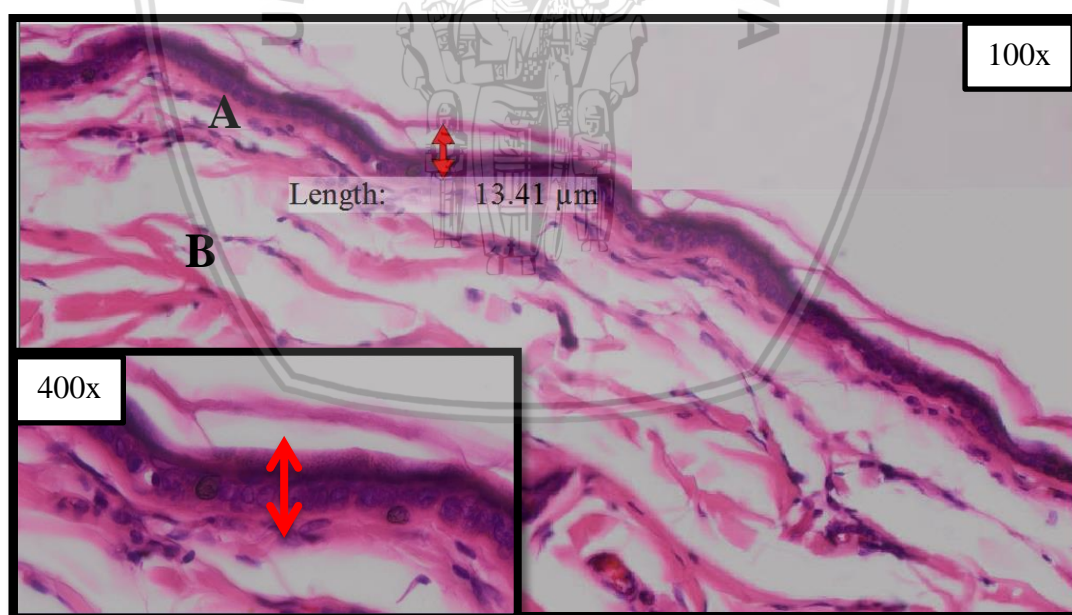
Pengamatan preparat histopatologi menggunakan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE) untuk melihat bagian epidermis. Perhitungan ketebalan lapisan epidermis dilakukan dari stratum corneum, stratum lusidum, stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum basalis. Stratum corneum merupakan lapisan

terluar yang paling atas terdiri dari beberapa lapis sel pipih, tidak berinti, dan memiliki keratin. Stratum lusidum merupakan lapisan yang tipis jernih yang ditemukan pada bagian kulit yang tebal seperti telapak tangan dan kaki. Stratum granulosum tersusun oleh sel-sel keratinosit, stratum spinosum memiliki sel kubus dengan inti besar dan oval. Stratum basalis merupakan lapisan terbawah dari epidermis yang terdiri dari sel-sel melanosit yang berfungsi membentuk pigmen melanin (Damanik, 2016). Parameter ketebalan epidermis dilakukan untuk mengetahui proses re-epitelisasi, dimana saat terjadi proses penyembuhan luka ditandai dengan re-epitelisasi pada saat fase proliferasi. Gambaran mikroskopis ketebalan epidermis diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x dapat dilihat pada **Gambar 5.3** hingga **Gambar 5.6**.

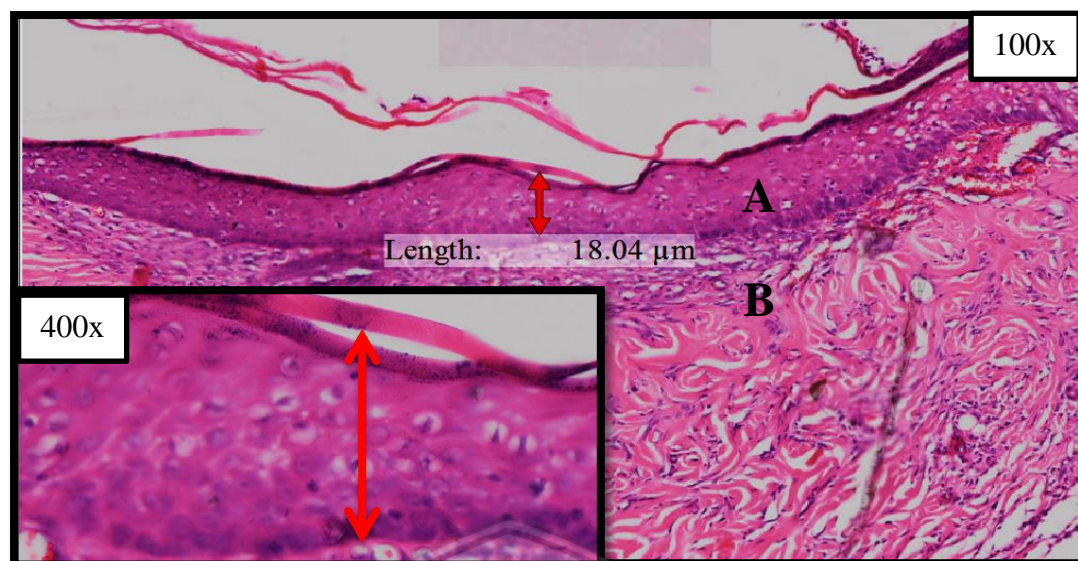




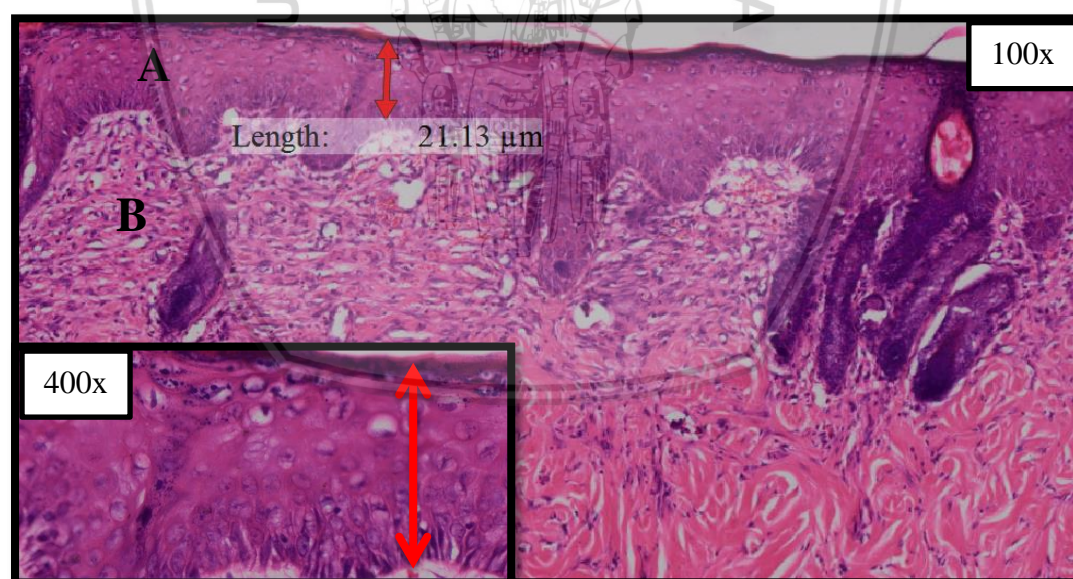
Gambar 5.3. Gambaran histopatologi ketebalan epidermis pada hari ke 10 kelompok terapi burnazin dengan menggunakan pewarnaan HE. Pada perbesaran 100x dengan *software ImageRaster* sebesar 21,47 μm dan perbesaran 400x tampak stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum basalis. Tanda garis merah (\longleftrightarrow) menunjukkan ketebalan epidermis. A (epidermis) B (dermis).



Gambar 5.4. Gambaran histopatologi ketebalan epidermis pada hari ke 10 kelompok terapi 5% dengan menggunakan pewarnaan HE. Pada perbesaran 100x dengan *software ImageRaster* sebesar 13,41 μm dan perbesaran 400x tampak stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum basalis. Tanda garis merah (\longleftrightarrow) menunjukkan ketebalan epidermis. A (epidermis) B (dermis).



Gambar 5.5. Gambaran histopatologi ketebalan epidermis pada hari ke 10 kelompok terapi 7,5% dengan menggunakan pewarnaan HE. Pada perbesaran 100x dengan *software ImageRaster* sebesar 18,04 μm dan perbesaran 400x tampak stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum basalis. Tanda garis merah (↕) menunjukkan ketebalan epidermis. A (epidermis) B (dermis).



Gambar 5.6. Gambaran histopatologi ketebalan epidermis pada hari ke 10 kelompok terapi 10% dengan menggunakan pewarnaan HE. Pada perbesaran 100x dengan *software ImageRaster* sebesar 21,13 μm dan perbesaran 400x tampak stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, dan stratum basalis. Tanda garis merah (↕) menunjukkan ketebalan epidermis. A (epidermis) B (dermis).

Proses re-epitelisasi merupakan proses pembaharuan epitel yang melibatkan prolifarsi dan migrasi sel epitel. Proses ini akan menghasilkan epitel yang utuh untuk menutup kerusakan jaringan dan kontaminasi dari lingkungan luar. Proses re-epitelisasi terdiri dari tahap proliferasi, migrasi dan diferensiasi sel epitel. Proses re-epitelisasi ditandai dengan penebalan jaringan epidermis. Kelompok terapi burnazin dan kelompok perlakuan (1,2,3) memiliki ketebalan epidermis yang berbeda-beda dikarenakan perbedaan dari zat aktif dan konsentrasi yang mempengaruhi proses re-epitelisasi. Data perhitungan ketebalan epidermis dari lima lapang pandang kemudian dianalisa secara statistika. Dilakukan uji normalitas dan homogenitas sebagai syarat ANOVA. Hasil perhitungan uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data terdistribusi secara normal dan homogen (**Lampiran 9**). Dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA dan diperoleh hasil nilai Sig. <0,05 yang berarti ada pengaruh dari masing-masing terapi yang diberikan. Setelah itu dilakukan uji lanjutan uji Tukey dan didapatkan hasil bahwa antar kelompok memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan. Hasil uji BNJ (**Lampiran 9**) ketebalan epidermis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 5%, 7,5%, dan 10% dapat dilihat pada **Tabel 5.2**

Tabel 5.2 Ketebalan Epidermis

Kelompok perlakuan	Rata-rata Ketebalan Epidermis (μm) \pm SD
Terapi Burnazin	$22,06 \pm 0,86^c$
(P1) Terapi 5%	$14,34 \pm 0,43^a$
(P2) Terapi 7,5%	$18,10 \pm 0,29^b$
(P3) Terapi 10%	$21,65 \pm 0,73^c$
Keterangan : Perbedaan notasi a, b, c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan	

Dari **Tabel 5.2** diketahui kelompok terapi burnazin memiliki rata-rata ketebalan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan dengan rata-rata ketebalan sebesar $22.06 \pm 0,86 \mu\text{m}$. Kelompok terapi burnazin memiliki rata-rata ketebalan yang lebih besar dikarenakan obat yang digunakan merupakan obat *gold standar* pada terapi luka bakar. Salep dengan zat aktif berupa silver sulfadiazine memiliki sifat antibakteri dan dapat mempercepat proses re-epitelisasi oleh karena kemampuannya mengaktifkan sel makrofag untuk menghasilkan *growth factor* yang berperan dalam proses penyembuhan luka. Pada kelompok terapi burnazin proses penyembuhan luka sudah memasuki fase proliferasi yang ditandai dengan re-epitelisasi karena terjadinya penebalan jaringan epitel.

Ketebalan epidermis pada kelompok terapi salep kolagen hidrolisat konsentrasi 5% berbeda nyata terhadap kelompok terapi burnazin, P2, dan P3 dengan rata-rata ketebalan $14,34 \pm 0,43 \mu\text{m}$. Ketebalan epidermis pada kelompok P2 terapi salep kolagen hidrolisat konsentrasi 7,5% berbeda nyata terhadap kelompok terapi burnazin, P2, dan P3 dengan rata-rata ketebalan $18,10 \pm 0,29 \mu\text{m}$ (**Tabel 5.2**). Terapi kelompok pada 2 perlakuan (P1 dan P2) memiliki ketebalan yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok terapi burnazin dan P3. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi 5% dan 7,5% salep belum bekerja secara sempurna sehingga lapisan dari stratum pada epidermis belum tersusun secara rapi.

Ketebalan epidermis pada kelompok terapi salep kolagen hidrolisat konsentrasi 10% rata-rata ketebalan sebesar $21,65 \pm 0,73 \mu\text{m}$. Hal ini tidak berbeda signifikan dengan kelompok terapi burnazin dengan rata-rata ketebalan sebesar $22.06 \pm 0,86 \mu\text{m}$. Menurut Kate (2017) rata-rata ketebalan epidermis

sebesar 21,3 μm sedangkan Liu (2009) menyebutkan bahwa ketebalan epidermis sebesar 21,7 μm . Jika dibandingkan dengan literatur maka kelompok perlakuan 3 dengan salep konsentrasi 10% sudah masuk proses re-epitelisasi dalam penyembuhan luka. Kolagen pada fase ini bekerja menginisiasi makrofag untuk menghasilkan *growth factor*. Migrasi dari proses proliferasi penutupan permukaan epitel hanya setebal dua sampai tiga sel membentuk lapisan sel basal. Pembentukan matriks sementara dilakukan oleh fibronectin dimana kolagen juga mengikat fibronectin bersama dengan trombosit. Puncak proliferasi sel terjadi dari hari ke 6 hingga dan berlanjut hingga proses re-epitelisasi selesai. Migrasi dan proliferasi keratinosit dipengaruhi beberapa faktor yaitu *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) (Meilawaty, 2013).

Berdasarkan hasil di atas, maka pemberian terapi salep kolagen hidrolisat pada tikus yang diinduksi luka bakar konsentrasi salep terbaik ditinjau dari ketebalan epidermis yaitu salep kolagen dengan konsentrasi 10%.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian, hasil dan pembahasan yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian salep kolagen hidrolisat dapat meningkatkan ekspresi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) pada kulit yang diinduksi dengan luka bakar derajat IIB dengan konsentrasi salep terbaik 10%.
2. Pemberian salep kolagen hidrolisat dapat meningkatkan ketebalan epidermis pada kulit yang diinduksi dengan luka bakar derajat IIB dengan konsentrasi salep terbaik 10%.

6.2 Saran

Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh berbagai sediaan topikal menggunakan kolagen hidrolisat untuk mempercepat proses penyembuhan luka. Selain itu juga dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan membandingkan kelompok perlakuan dengan kelompok terapi yang memiliki mekanisme kerja yang sama dengan kolagen.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrahmat, 2014. Luka, Peradangan, dan Pemulihan. *Jurnal Entropi*. Vol.9 No.2
- Argamula, G. 2008. *Aktivitas Sediaan Salep Ekstrak Batang Pohon Pisang Ambon (Musa paradisiaca var sapientum) Dalam Proses Persembuhan Luka Pada Mencit (Mus musculus albinus)*. Fakultas Kedokteran. Institut Pertanian Bogor
- Balqis, 2014. Proses Penyembuhan Luka Bakar Dengan Gerusan Daun Kedondong (*Spondias dulcis* F.) dan Vaseline Pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Secara Histopatologis. *Jurnal Medika Veteriner*. Vol. 8 No. 1
- Balqis, U., Rasmaidar, dan Marwiyah. 2014. Gambaran Histopatologi Penyembuhan Luka Bakar Menggunakan Daun Kedondong (*Spondias dulcis* F.) dan Minyak Kelapa Pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*). *Jurnal Medika Veterinaria* 8(1):31-36
- Bishara, A., Juan, P.B., Duhai, H., Franck, D., Fowler, A., Stuart, E., Elizabeth, G., Magnette, A., Heniz, R., and Xia, Z. 2014. *Best Practice Guidelines : Effective Skin and Wound Management of Non-Complex Burns*. International Best Practice. UK. London
- Chrysman, 2010. *Perbandingan Efek Ekstrak Kunyit (Curcuma domestica Val) dan Madu (Mel deporatum) Terhadap Penyembuhan Luka Insisi Pad Mencit (Mus musculus) Swiss Webster Jantan*. Fakultas Kedokteran. Universitas Kristen Maranatha
- Corwin, E. J. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Jakarta: EGC
- Damanik, U. M. 2016. *Ketebalan Kulit Tikus Putih (Rattus novergicus) Hewan Model Monopause yang Diberi Tepung Teripang Pasir (Holathuria scabra)*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- Demidova, R. T. N., M. R. Hamblin., I. M. Herman. 2012. *Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Cre*. National Institutes of Health
- Departemen Kesehatan RI. 2008. *Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) : Laporan Nasional*: Jakarta
- Dida, 2011. *Dukungan Nutrisi Pada Penderita Luka Bakar*. Fakultas Kedokteran. Universitas Padjajaran
- Dominic, T and M, Jason. 2014. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. Science Direct Vol 15. NO.9:415-419

- Efrizal, N. S. S., R. Rahayu. 2014. Pengaruh Gambir (*Uncaria gambir R.*) Terhadap Penyembuhan Luka Bakat pada Mencit Putih (*Mus musculus L.*) Jantan. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. Vol.3. No.4: 283-288
- Eming.S.A., T. Krieg., M.J. Davidson. 2007. Inflammation in Wound Repair : Molecular and Cellular Mechanism. *Journal Of Investigative Dermatology*. Vol 17
- Faudi, M. I., U. Elfiah., Misnawi. 2015. Jumlah Fibroblast pada Luka Bakar Derajat II pada Tikus Dengan Pemberian Gel Ekstrak Etanol Biji Kakao dan Silver Sulfadiazine. *Jurnal Pustaka Kesehatan*. Vol 3. No.2: 245-247
- Ferdinant, M. D dan Imam, S. 2013. Pengaruh Pemberian Topikal *Low Molecular Weight Hyaluronate* pada Ekspresi VEGF Luka Superfisial yang Dirawat Dengan Membran Amnion *Freeze-Dried*. *Majalah Patologi*. Vol 22. No.1: 40-41
- Fowler, A. 2013. *Treating Burnt Wildlife*. Austalian Veterinary Association
- Gauglitz, G., S. Shahrokhi., M. Jeschke. 2012. *Treatment of Infection in Burns*. New York: Springer Wien, pp221-240
- Guo, S and L. A. DiPietro, 2010. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*. Vol.8. No.3: 219-229
- Guo, S dan L.A. Dipietro. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res* 89(3): 219-229
- Gurtner, G. C. 2007. *Wound Healing : Normal and Abnormal*. Grabb and Smith Plastic Surgery. Sixth Edition. Philadelphia. P19-24
- Jansen and Chemayanti, 2015. Burn Wound Healing Activity of Hydrolyzed Virgin Coconut Oil. *International Jurnal of PharmTech Research*. Vol. 8 No.1
- Kalangi, S. J.R. Histofisiologi Kulit. 2013. *Jurnal Biomedik*. Vol. 5 No. 3:13-14
- Kartiningtyas, A. T., Prayitno, dan S.P. Lastiany. 2015. *Pengaruh Aplikasi Gel Ekstrak Kulit Citrus sinensis Terhadap Epitelisasi pada Penyembuhan Luka Ginggiva Tikus Sprague Dawley*. *Fakultas Kedokteran Gigi*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Kate, C., M. D. Spain. 2017. The Relation Between The Structure of The Epidermis of The Rat and Guinea Pig, and The Proliverative Power of Normal and Regenerating Epithelial Cells of The Same Species. *Journal of Experimental Medicine*. Vol 21. No. 3: 194
- Keast, D., L.F. Lalande., and M.F. Mafie 2011. *Basic Principle of Wound Healing*. Sains Des Palaies Canada 9 (2) : 4-8

- Koolhaas, J.M. 2010. *The Laboratory Rat*. Universities Federation for Animal Welfare
- Krinke, G. J. 2000. *The Handbook of Experimental Animals The Laboratory Rat*. Academy Press, New York. Pp 45-50, 295-296
- Kristiana, H. 2008. *Gambaran Darah Mencit (Mus musculus albinus) yang Diberi Salep Ekstrak Etanol dan Fraksi Hexan Rimpang Kunyit (Curcuma longan Linn.) Pada Proses Persembuhan Luka*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- Kusriningrum, 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga. Surabaya
- Leslie DeSanti. 2005. Pathophysiology and Current Management of Burn Injury. *Wound Care Journal*. Vol 18. No. 6. p 325-327
- Lie, T. M. S., 2011. Peran Sel Mast Dalam Reaksi Hipersensitivitas Tipe-I. *Jurnal Kedokteran Universitas Trisakti*. Vol. 18. No. 3
- Liu, J., D. Kim., L. Brown., T. Madsen., G. F. Bouchard. 2009. *Comparison of Human, Porcine, and Rodent Wound Healing With New Miniature Swine Study Data*. Sinclair Research Center. USA
- Lucia dan Elsy. 2014. *Respon Adaptasi Fisiologis dan Psikologis Pasien Luka Bakar yang Diberikan Kombinasi Alternative Moisture Balance Dressing dan Seft Terapi di RSUP Yogyakarta*. Muhammadiyah Journal of Nursing
- Mawarsari, T. 2015. *Uji Aktivitas Penyembuhan Luka Bakar Ekstrak Etanol Umbi Talas Jepang (Colocasia esculenta (L.) Schoot var. antiquorum) Pada Tikus Putih (Rattus novergicus) Jantan Galur Sprague Dawley*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah
- McGavin, M.D. and J.F. Zachary. 2007. *Pathologic Basic of Veterinary Disease*. United States: Mosby Elsevier. 4, 186-190
- Meilawaty, Z. 2013. *Pemberian Ekstrak Metanolik Getah Biduri (Calotropis gigantea) Terhadap Ketebalan Epitel Ginggiva Tikus Wistar*. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Jember
- Moenadjat, Y. 2009. *Luka Bakar: Masalah dan Tata Laksana*. Jakarta: Balai Penerbitan FK UI
- Mohammad, A. W., Norhazwani, M.S., Abdul, G. K.A.A., and Jamaliah, M. J. 2014. Process for Production of Hydrolised Collagen from Agriculture Resources: Potential for Future Development. *Journal of Applied Science*. Vol. 14. No.12:1319-1323
- Morwal, S. 2016. Clinico-Therapeutic Management of First and Second Degree Burns in Cattle and Buffaloes. *International Journal of Veterinary Science*. Vol 5(4): 302-303

- Nareswari, N. 2011. *Pembuatan Salep Minyak Atsiri Daun Jeruk Limau (Citrus amblycarpa (Hassk) osche) Dan uji Stabilitas Terhadap Tipe Basis Yang Digunakan* [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret
- Novriansyah. 2008. *Perbedaan Kepadatan Kolagen di Sekitar Luka Insisi Tikus Wistar yang Dibalut Kasa Konvensional dan Penutup Oklusif Hidrokoloid Selama 2 dan 14 Hari* [Tesis]. Universitas Diponegoro
- Nurdiana, Hariyanto, dan Musfirah. 2008. Perbedaan Kecepatan Penyembuhan Luka Bakar Derajat II Antara Perawatan Luka Menggunakan
- Nurhayati., Tazwir., dan Murniyati. 2013. Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Larut Asam Dari Kulit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Kelautan dan Perikanan*. Vol. 8. No. 1
- Potter, W.P. 2007. *Rats and Mice : Introduction and Use In Research Health Sciences Center foe Educational Resources*. University of Washington
- Prasetyo, B., Wientarsih., dan Priosoeryanto, B.P. 2010. Aktivitas Sediaan Gel Ekstrak Batang Pohon Pisang Ambon Dalam Proses Penyembuhan Luka Pada Mencit. *Jurnal Veteriner* 11(2): 70-73
- Pribadi, G. A. 2008. *Penggunaan Mencit dan Tikus Sebagai Hewan Model Penelitian Nikotin*. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor
- Rahayuningsih, T. 2012. *Penatalaksanaan Luka Bakar (Combustio)*. Politeknik Kesehatan Bhakti Mulia Sukoharjo
- Rohmawati. 2008. *Efek Penyembuhan Luka Bakar Dalam Sediaan Gel Ekstrak Etanol 70% Daun Lidah Buaya (Aloe vera L.) Pada Kulit Punggung Kelinci New Zealand* [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Roskoski, R. 2007. *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumor Progression*. Elsevier
- Schultz, G. S. 2007. *The Physiology of Wound Bed Preparation*. In Granick, MS Ganeli RL., (Eds). *Surgical Wound Healing and Management*. Informa Healthcare USA Inc. New York, p 1-5
- Setyowati, H dan Wahyuning, S. 2015. Potensi Nonkolagen Limbah Sisik Ikan Sebagai Cosmeceutical. *Jurnal Farmasi dan Sains*. Vol.12. No.1:30-40
- Sinko, P. J. 2006. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*. 5th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia
- Sofyan, E., A. Bukhari., Nurpudji, A. T. 2013. *Pengaruh Zink, Vitamin C, dan Ekstrak Ikan Gabus Terhadap Keseimbangan Nitrogen Pasien Luka Bakar Grade II A-B*. Fakultas Kedokteran. Universitas Hasanuddin

- Sussman, C. 2007. *Wound Care: A Collaborative Practice Manual for Health Professionals*, Lippincot & Wilkins, Philadelphia, 40-41
- Syailindra,F. 2017. *Perbedaan Penyembuhan Luka Sayat Secara Makroskopis Antara Pemberian Topikal Ekstrak Sel Punca Mesenkimal Tali Pusat Manusia Dengan Povidone Iodine Pada Tikus Putih Jantan (Rattus novergicus). Galur Sprague dawley*. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung
- Thamrin, H.M. 2016. *Imunolokalisasi Epidermal Growth Factor (EGF) Pada Luka Bakar Tikus Putih (Rattus novergicus) Yang Diinduksi Ekstrak Media Penumbuh Sel Punca Mesenkimal*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada: Yogyakarta
- Tiwari. 2012. Burn Wound: How It Differs From Other Wounds. *Indian Journal of Plastic Surgery*. Vol. 45
- Westgate, S., Cutting.K.F., Deluca, G., Assad,K. *Collagen Dressings Products for Practice*. Wound UK 8(1):1-2
- Widyaningsih.T.D., C.T. Milala., D. Okkie. 2015. Efek Antiinflamasi Dari Ekstrak Glukosamin Ceker Ayam Pada Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Karagenan. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol. 3 No.3
- William, S. L and D.P. Hopper. 2007. *Understanding Medical Surgical Nursing 3th Ed*. Philladelphia: Davis Company
- Yuliani, I dan S. Tasmiatun. 2012. *Pengaruh Pemberian Coconut Oil Secara Topikal Terhadap Histologi Penyembuhan Luka Bakar Termal Pada Kulit Tikus Putih (Rattus novergicus)*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Yogyakarta